



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ESTUDO *IN VITRO* DO PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR NA MORFOGÊNESE
DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA DE CAMUNDONGOS

Bruno Costa da Silva

Orientadora: Dr^a Andréa Gonçalves Trentin
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

Florianópolis, julho de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ESTUDO *IN VITRO* DO PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR NA MORFOGÊNESE
DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA DE CAMUNDONGOS

Bruno Costa da Silva

Orientadora: Dr^a Andréa Gonçalves Trentin
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de
grau de Mestre.

Florianópolis, julho de 2007.

**“ESTUDO *IN VITRO* DO PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR NA MORFOGÊNESE
DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA DE CAMUNDONGOS”**

BRUNO COSTA DA SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurobiologia Celular e Molecular aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientadora

Andréa Gonçalves Trentin

Coordenador do Curso

Adair Roberto Soares dos Santos

Banca Examinadora

Andréa Gonçalves Trentin (Presidente)

José Garcia Abreu Ribeiro Júnior (Membro)

Yara Maria Rauh Muller (Membro)

Margherita Anna Antonia Maria Barracco (Suplente)

*“O estudo, a busca da verdade e da beleza
são domínios em que nos é consentido
sermos crianças por toda a vida”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À professora Andréa Gonçalves Trentin, pela oportunidade de ingresso na carreira científica, pela confiança e respeito ao meu trabalho, pelo constante encorajamento ao meu lado criativo e ambicioso, por ser uma referência de liderança e de pesquisador de sucesso, pelo tratamento maternal demonstrado em todos os momentos, pelos conselhos, valiosos ensinamentos e companheirismo.

Ao professor Márcio Alvarez da Silva, que apresentou a mim em suas sempre interessantes e envolventes aulas e dentro do ambiente de laboratório um dos temas pelos quais tenho maior paixão, a Biologia Celular.

Ao professor José Garcia Abreu Ribeiro Júnior, pela chance única de trabalhar em seu laboratório na Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde em um curto espaço de tempo pude aprender lições valiosíssimas para a carreira e a vida. Dentre elas a importância da confiança no próprio trabalho na busca do sucesso, que deve ser natural a quem escolhe a carreira científica, por vezes, abdicar de finais de semana, feriados, horas suficientes de sono e festas. Ele me ensinou ainda que neste ramo é essencial manter boas relações com o máximo de pessoas possível, tendo em mente que, como ele mesmo mencionou, “o mundo dá voltas”. E por último, porém não menos importante, apoio e entusiasmo demonstrado ao avanço na minha carreira.

Ao professor Vivaldo Moura Neto, pela chance de ir ao Rio de Janeiro, podendo lá ter estagiado no laboratório do professor Garcia e ter tido contato com ícones da ciência nacional, como os professores Roberto Lent, Radovan Borojevic e, obviamente, com a sua própria pessoa e o professor Garcia. Pela confiança demonstrada ao meu

trabalho tanto na bancada quanto nas reuniões de planejamento de experimentos, onde demonstrou por que é um dos membros da Academia Brasileira de Ciências.

À professora Margherita Anna Antonia Maria Barracco, pela eterna cordialidade como vizinha de corredor e pelo apoio inestimável dado ao meu crescimento na carreira científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de iniciação científica e pelo apoio financeiro aos projetos.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), PRONEX/CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro aos projetos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD, Brasil), pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro aos projetos.

À mãe, amiga, parceira, conselheira, defensora, professora, orientadora e referência Claudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, por ter sido quem deu a chance de trabalhar em meu primeiro projeto de pesquisa. Por ter sido quem me ensinou praticamente tudo que sei em Ciência, por defender-me de quaisquer ameaças e, obviamente, por ser esposa do Lúcio, uma das pessoas mais inteligentes, parceiras, animadas, talentosas pilotando uma churrasqueira e de maior coração que conheço.

Ao mestre e amigo Giordano Wosgrau Calloni, não somente pelos memoráveis momentos de gargalhadas nos intervalos dos experimentos durante suas tiradas ácidas e sarcásticas e seus “ataques de fúria”, mas principalmente pelos ensinamentos que foram sem sombra de dúvidas essenciais ao meu amadurecimento como pessoa e cientista. Pelas conversas intermináveis quanto ao ser humano, onde ensinou a não me intimidar pelo julgamento alheio, que o ser humano age muitas vezes de forma

egoísta e que os julgamentos que tecemos uns sobre os outros são sempre para tentarmos esconder nossas próprias mazelas e sentimentos de inferioridade.

Ao parceiro e amigo mais cientista e genial que tenho, Ricardo Castilho Garcez, pelos momentos divertidos dentro e fora do laboratório, pela escapadas para o IEGA ou mercado público durante o expediente, pela parceria nas inesquecíveis cantorias adentrando a madrugada em Caxambu (no saudoso bar do Kiko, vulgo panela mineira) e Águas de Lindóia, pelos conselhos, confiança, modelo de profissionalismo, honestidade e lealdade.

Ao Marco Augusto Stimamiglio, pela amizade e paciência durante meus primeiros dias de laboratório, quando me ensinou as noções de manipulação de células e me explicou numerosas vezes o significado daqueles nomes então sem o menor sentido, como PBS, DMEM, RPMI, tripsina, glioma C6, DMSO, milliQ, Eppendorf, Falcon, etc.

Ao mais novo, porém não menos memorável amigo Ricardo Muller, ou simplesmente New, pelos momentos hilários e divertidos em nossas conversas “nonsense”, ácidas e sarcásticas no laboratório, pelos memoráveis churrascos e pela ajuda nas minhas atividades mais maçantes no laboratório, como manutenção e acasalamento de camundongos.

À Meline Coelho da Costa, pela amizade, cumplicidade e pela inestimável parceria na implementação do modelo de crista neural no laboratório.

À Fernanda Rosene Melo, pela grande ajuda nas atividades relacionadas ao projeto de crista neural.

Aos demais colegas e ex-colegas de laboratório Talita, Suelen, Bianka, Bianca, Ricardo Alchini, Cynara, Fabiola, Caroline, Ezequiel, Aloísio, Marcos, Evaldo, Pâmela,

Juliana, Gabriela, Íris, Ellen, Denise, Maristela, Maria Cecília, Mariana, Evelin e Lisiane, pela alegria, amizade e companheirismo de sempre.

À minha amiga e namorada Larissa Herkenhoff Haut, pela amizade, carinho, encorajamento, parceria e paciência em muitos experimentos noite adentro, em finais de semana e feriados, e por acreditar nas minhas habilidades e potenciais como cientista.

Em especial aos meus pais Álvaro e Maria Alice, pela educação, amor, amizade, companheirismo, valores, referências de honestidade, caráter, lealdade, justiça, humildade, ambição e respeito. Por se interessarem honestamente pelo meu dia-a-dia no laboratório, buscando de forma sincera entender o que faço na bancada, na maioria das vezes tecendo comentários altamente pertinentes sobre o assunto, e por serem sem dúvida os maiores entusiastas do meu sucesso.

À minha irmã Sabrina e seu marido Rodrigo, pela amizade e entusiasmo em cada passo dado adiante na minha carreira.

Sumário

Lista de abreviaturas	i
Lista de símbolos	iii
Lista de figuras	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução	01
1.1. Células tronco	01
1.1.1. Células tronco da crista neural	01
1.2. Diferenciação celular	07
1.3. Morte Celular	08
1.4. Proteínas da matriz extracelular	09
1.4.1. Lamininas	11
1.4.2. Fibronectina	12
1.4.3. Colágenos	14
1.5. Papel da interação célula-MEC no desenvolvimento	16
1.5.1. Papel da interação célula-MEC no desenvolvimento da CN	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3. Materiais e métodos	21
3.1. Materiais	21
3.1.1. Reagentes	21

3.1.2. Equipamentos	22
3.2. Animais	22
3.3. Cultura de células	23
3.3.1. Culturas primárias	23
3.3.2. Culturas secundárias	24
3.3.3. Meio de Cultura	25
3.4. Avaliação da migração celular	25
3.5. Imunocitoquímica	25
3.6. Avaliação da Morte Celular por Apoptose	26
3.7. Avaliação da Proliferação celular por incorporação com BrdU	27
3.8. Ensaio de Inibição por GRGDS	27
3.9. Análise Estatística	28
5. Discussão	44
5.1. Efeito diferencial da matriz extracelular na migração das células da crista neural cefálica	44
5.2. Efeito da matriz extracelular na diferenciação e proliferação da crista neural cefálica	45
5.3. Considerações finais	49
6. Conclusões	52
7. Anexos	53
7.1. Anexo I	53
7.2. Anexo II	53
8. Referências bibliográficas	54

Lista de abreviaturas

α -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
ANOVA	Análise de variância de uma via
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Fator morfogênico de osso
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CL	Colágeno
CN	Crista neural
CT	Célula tronco
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento de Epiderme
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FN	Fibronectina
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GFAP	Proteína Fibrilar Ácida de células Gliais
Glicerina	Solução de glicerina em tampão carbonato-bicarbonato a pH 9,0
Tamponada	–
GRGDS	Peptídeo de Glicina-Arginina-Glicina-Asparagina-Serina
Ig	Imunoglobulina
KDa	Kilo Daltons
LN	Laminina
MEC	Matriz extra celular
mg	Miligramas
mm	Milímetros
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
NS	Sem diferenças estatisticamente significantes

- PBS – Solução salina tamponada por fosfato
- PBS Triton – PBS contendo 0,2% de Triton X100
- PBS Tween – PBS contendo 0,05% de Tween 20
- PF – Paraformaldeído
- PGs – Proteoglicanos
- RGD – Peptídeo de Arginina-Glicina-Asparagina
- RPM – Rotações por minuto
- SCF – Fator de crescimento de células tronco
- SFB – Soro Fetal Bovino
- SMA – Actina de Músculo Liso
- T3 – 3-3'-5 triiodo-L-thironina
- TGF – Fator de crescimento transformador
- TxRd – Vermelho do Texas

Lista de símbolos

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
$^{\circ}$	Grau
%	Por cento
μ	Miu
η	Eta
U	Unidades
δ	Delta
<	Procedência menor

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama esquemático das regiões do sistema nervoso central em desenvolvimento	03
Figura 2. Alguns derivados da crista neural	04
Figura 3. Diagrama esquemático das rotas migratórias na CN Cefálica	05
Figura 4. Diagrama esquemático das rotas migratórias na CN truncal	07
Figura 5. Organização dos complexos multifuncionais de proteínas e proteoglicanos da matriz extracelular	10
Figura 6. Estrutura em subunidades de um receptor de membrana do tipo integrina	11
Figura 7. Estrutura da laminina	12
Figura 8. Estrutura da fibronectina com o sítio RGD de ligação à célula	14
Figura 9. Estrutura em tripla helice do colágeno IV	16
Figura 10. Procedimento cirúrgico para a remoção do embrião de camundongo de 8,5 dias e do tubo neural	24
Figura 25. Efeito da FN sobre a diferenciação das células da CN em miofibroblastos.	51

Resumo

Dentre os principais componentes de matriz extracelular (MEC) depositados nas rotas migratórias da crista neural (CN) destacam-se as moléculas de colágeno IV (CL IV), fibronectina (FN) e laminina (LN). Apesar de numerosos estudos demonstrarem o papel destas moléculas da MEC na migração da CN, pouco se sabe sobre seus efeitos na proliferação e diferenciação da CN. No presente trabalho demonstramos que CL IV, FN e LN afetam diferentemente a migração, diferenciação e proliferação da CN cefálica murina. Observamos um padrão de migração similar sobre FN e CL IV, sendo estes valores ($2,09$ e $1,85 \times \text{mm}^2$, respectivamente) maiores do que os observados sobre LN ($1,37 \times \text{mm}^2$). Já a proliferação celular da CN foi mais pronunciada sobre LN (69% das células), valor duas e sete vezes maiores do que os observados em FN e CL IV, respectivamente. Quanto à diferenciação celular, CL IV apresentou a maior proporção de neurônios (4%) e a menor proporção de células gliais (17%). Por outro lado, FN apresentou a expressão mais pronunciada de miofibroblastos (20%), sendo este efeito resultado principalmente de uma elevada diferenciação deste fenótipo na fase pós-migratória, apresentando a proliferação celular papel menos importante neste processo. Verificamos ainda que a morte celular também parece não influenciar esse processo. Ensaio de inibição utilizando o peptídeo GRGDS sugerem que o efeito da FN na expressão de miofibroblastos ocorre por meio de interação integrina-sítio RGD de FN. Desta forma pudemos constatar que a FN é um componente microambiental capaz de influenciar a diferenciação da CN em miofibroblastos.

Abstract

Type IV collagen (CL IV), fibronectin (FN) and laminin (LN) are primary components of the extracellular matrix (ECM) deposited along neural crest (NC) migratory pathways. Although numerous experiments have demonstrated the influence of these molecules in NC migration, very little is known about their function in NC differentiation and proliferation. In the present work it was shown that CL IV, FN and LN differently affect the migration, proliferation and differentiation of murine cranial NC. NC cells migrate similarly on FN and CL IV ($2,09 \pm 1,85 \times \text{mm}^2$, respectively), being these values higher than those obtained on LN ($1,37 \times \text{mm}^2$). On the other hand, LN displayed the highest values of cell proliferation (69% of the cells), being this value two and seven-folds higher than the observed on FN and CL IV, respectively. CL IV presented the highest proportion of neurons (4%) and the lowest proportion of glial cells (17%). On the other hand, FN displayed the highest expression of myofibroblasts (20%). Such effect results of a high differentiation of this cell phenotype at the post migratory phase, being considered the proliferation of such cell phenotype a little important event to this process. We also verified that the overall cell death also does not look to influence such process. Inhibition assays using GRGDS suggest that the FN effect in myofibroblast expression occurs due to integrin-FN RGD site interactions. In conclusion, we could observe that FN is an important microenvironmental component able to influence the NC differentiation into myofibroblasts.

1. Introdução

1.1. Células tronco

Célula tronco (CT) é tradicionalmente definida como uma célula capaz de se auto-renovar e diferenciar em ao menos 2 fenótipos celulares diferentes (WEISSMAN, 2000a, 2000b). A auto-renovação pode se dar por divisão simétrica, onde há geração apenas de novas células tronco, ou assimétrica, onde há geração de novas células tronco juntamente com células progenitoras (células parcialmente comprometidas fenotipicamente) (SANDERS *et al.*, 2006).

1.1.1. Células tronco da crista neural

A complexidade do corpo dos vertebrados é dada em grande parte pela crista neural (CN), uma fonte de células mesenquimais multipotentes originada na borda das ectodermes neurais e não neuronais (LE DOUARIN, 1999; HUANG; SAINT-JEANNET, 2004).

A existência das células da CN em vertebrados agnatos (MCCAULEY; BRONNER-FRASER, 2006) e possivelmente em outros vertebrados primitivos (XIAN-GUANG *et al.*, 2002), sugere o surgimento da CN já nos primeiros vertebrados. Devido à aparente ausência de células migratórias na região dorsal do tubo neural e dos principais derivados da CN em cordados invertebrados, tem sido amplamente aceita a idéia de que esta população celular teve sua origem evolutiva nos primeiros vertebrados, podendo ter sido uma estrutura chave para a evolução deste subfilo (SHIMELD; HOLLAND, 2000). Entretanto os cordados invertebrados possuem algumas estruturas semelhantes aos derivados da CN como células neurogênicas migratórias (JEFFERY, 2007), tecidos semelhantes à cartilagem (BRITTAN; WRIGHT, 2004),

células pigmentadas (JEFFERY, 2007) e neurônios sensoriais periféricos (HOLLAND *et al.*, 1996). Estas estruturas permitem a sugestão de que as células da CN possam não ser restritas a vertebrados (MANNI *et al.*, 2001; BLAIR; HEDGES, 2005). Desta forma ainda é pouco claro se a CN surgiu nos vertebrados primitivos ou se é uma estrutura derivada das células semelhantes à CN encontrada em cordados invertebrados (JEFFERY, 2007).

A CN é uma estrutura originada no processo de neurulação, onde ocorre o dobramento da neuroectoderme (placa neural) sobre si para a formação do tubo neural. Este processo se inicia durante a gastrulação, quando o neuroepitélio é induzido a se diferenciar a partir da ectoderme da linha média dorsal. Uma sequência de interações moleculares envolvendo o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o antagonismo promovido pelo fator morfogênico de osso (BMP) têm se demonstrado importantes na mediação da indução neuronal (STERN, 2002). A placa neural formada passa então por uma série de processos celulares coordenados, denominados de extensão convergente, onde células se movem medialmente, se intercalando na linha média (KELLER, 2002).

As células da CN murina são geradas ao longo de quase todo o eixo corporal na interface entre a superfície da ectoderme e a placa neural do embrião, em uma região denominada de borda da placa neural. Durante este processo de indução, as células neuroepiteliais sofrem uma transformação epitelial-mesenquimal e emigram do tubo neural, sendo necessárias significantes alterações de padrões de citoarquitetura e de adesão (TRAINOR, 2005). A indução da CN se dá principalmente pela expressão de genes da família de fatores de transcrição tipo dedos de zinco *Snail* (NIETO *et al.*, 1994; MAYOR; MORGAN; SARGENT, 1995), os quais exercem papéis essenciais na

transformação epitelio-mesenquimal por reprimirem a expressão da molécula de adesão E-caderina (CANO *et al.*, 2000).

A formação e migração da CN murina inicia-se aproximadamente no estágio de 4 a 5 somitos, na região caudal ao mesencéfalo e rostral ao rombencéfalo (NICHOLS, 1986). Tal processo continua simultaneamente rostralmente no sentido do prosencéfalo e caudalmente a esta estrutura (Figura 1).

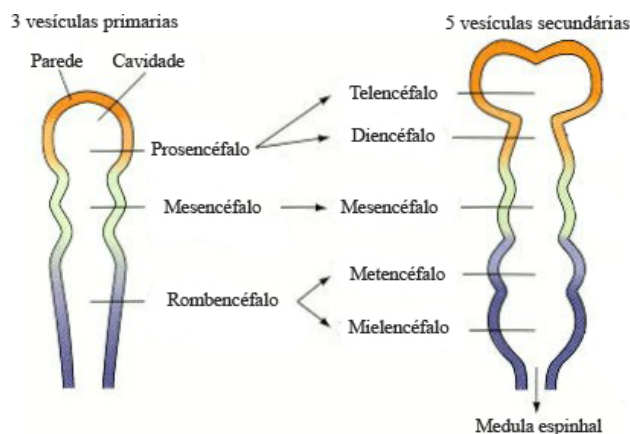


Figura 1. Diagrama esquemático das regiões do sistema nervoso central em desenvolvimento (GILBERT, 2003).

Em embriões de aves, a migração da CN inicia após o fechamento do tubo neural. Entretanto, este não é o caso dos mamíferos, onde a formação e migração da CN inicia logo após o início fusão das duas metades bilaterais da placa (TRAINOR, 2005). Normalmente há um curto intervalo de tempo no qual as células da CN são induzidas a se soltarem e emigrarem da porção dorsal do tubo neural, sendo que este período, em camundongos, dura aproximadamente 7 a 9 horas (OSUMI-YAMASHITA *et al.*, 1994).

Durante e após seu processo de migração pelo embrião, as células da CN se diferenciam em uma ampla variedade de fenótipos celulares (Figura 2). A CN origina todos os melanócitos do corpo (com exceção do epitélio pigmentar retinal que possui origem no neuroepitélio óptico) (BHARTI *et al.*, 2006), a maioria dos neurônios e células gliais do sistema nervoso sensorio, simpático e parassimpático; células adrenomedulares; e musculatura lisa, ossos e cartilagens da região crânio-facial (LE DOUARIN, 1999). A CN pode ser dividida em quatro domínios principais distribuídos ao longo do eixo antero-posterior, que em certos trechos podem se sobrepor, cada um com derivados e funções características.

Figura 2. Alguns derivados da crista neural

Derivado	Tipo celular ou estrutura derivada
Sistema nervoso periférico	Neurônios, incluindo gânglios sensoriais, gânglios simpáticos e parassimpáticos e plexos Células Gliais e de Schwann
Derivados endócrinos e paraendócrinos	Medula da glândula adrenal, células secretoras de calcitonina, corpo carótido das células tipo I
Melanócitos	Melanócitos epidermais
Cartilagem e ossos faciais	Osteócitos e condrócitos
Tecidos conjuntivos	Epitélio e estroma da córnea Papilas dentárias Derme, musculatura lisa e tecido adiposo da pele da cabeça e do pescoço Tecido conjuntivo das glândulas salivares, lacrimais, tireóide, pituitária e timo Tecido conjuntivo e musculatura lisa de artérias de origem aórtica

Fonte: (GILBERT, 2003)

A CN cefálica (também denominada CN craniana ou cranial), que vai da porção media do diencéfalo até o início dos somitos (caudalmente ao terceiro arco faríngeo) (PLA; LARUE, 2003), migra dorso-lateralmente (Figura 3) e produz um mesênquima que se diferencia em cartilagem, ossos, nervos cranianos, células gliais e tecidos conectivos da cabeça (DARLAND; LEBLANC, 1996). Estas células migram entre os rombômeros do rombencéfalo e entram pelos arcos faríngeos e outros tecidos em formação da cabeça, vindo a dar origem ao timo, odontoblastos, ossos do ouvido médio e da mandíbula (GILBERT, 2003).

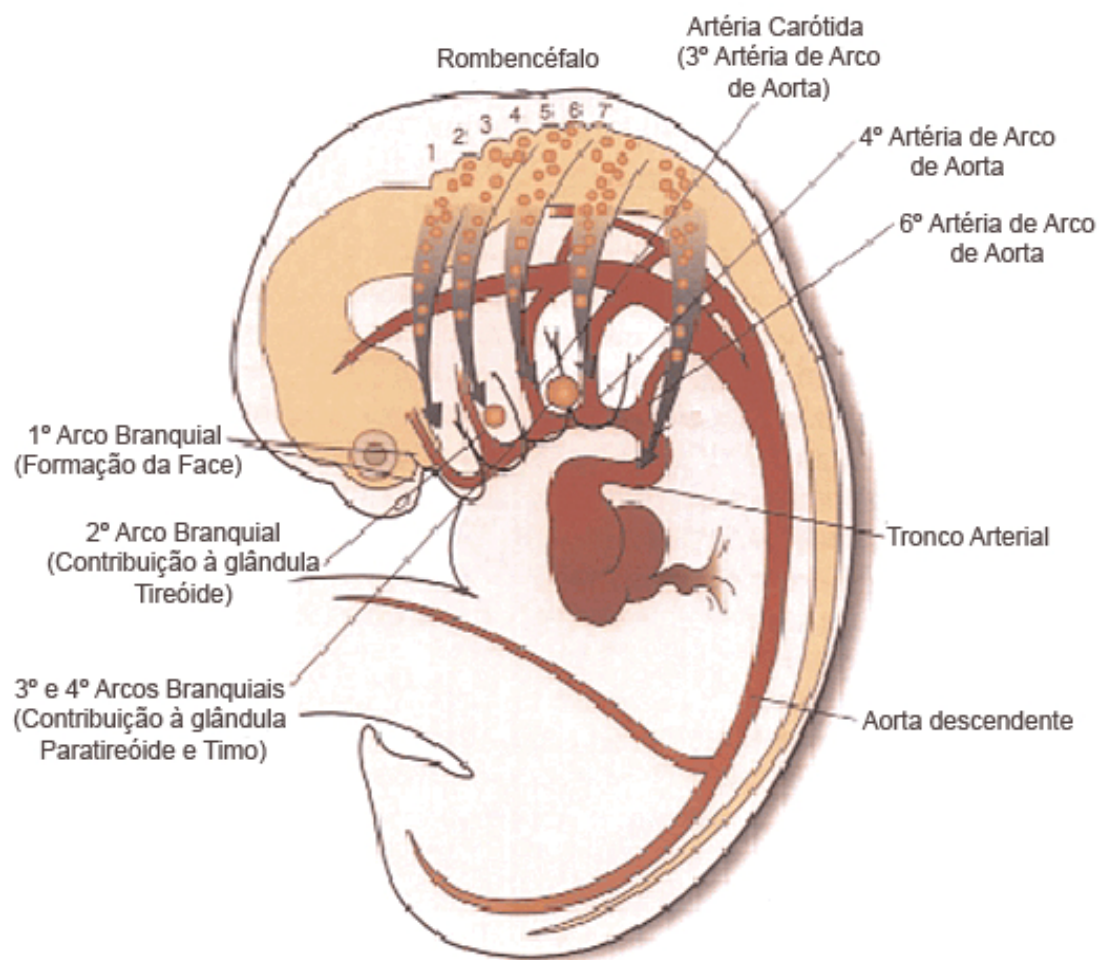


Figura 3. Diagrama esquemático das rotas migratórias na CN Cefálica (SCHINKE; IZUMO, 1999).

A CN cardíaca, considerada por muitos autores uma subdivisão da CN cefálica (LE DOUARIN, 1999; HUTSON; KIRBY, 2007), se insere entre o placóide ótico e a extremidade caudal do terceiro par de somitos, correspondendo aos rombômeros 6 a 8 (HUTSON; KIRBY, 2007). A CN cardíaca parece representar uma região transitória entre a CN cefálica e truncal devido ao fato de apresentar algumas propriedades de ambas as regiões. A CN desta região dá origem a melanócitos, neurônios (incluindo a inervação parassimpática do coração) (KIRBY; STEWART, 1983), cartilagem, todo o tecido conectivo e muscular das grandes artérias do coração, septo aórtico-pulmonar, tecido conectivo das glândulas tireóide, paratireóide e timo (LE LIEVRE; LE DOUARIN, 1975; BOCKMAN; KIRBY, 1984), válvulas semilunar e átrio-ventricular (WALDO; LO; KIRBY, 1999; NAKAMURA; COLBERT; ROBBINS, 2006).

Já as células da CN vagal (localizados na altura do primeiro ao sétimo somito) e sacral (localizadas na altura do vigésimo oitavo somito até a extremidade caudal do tubo neural) (PLA; LARUE, 2003), originam a maior parte do sistema nervoso entérico, especialmente o gânglio parassimpático do intestino (DONNELL; BANNIGAN; PURI, 2005).

A CN truncal, que é localizada na altura do oitavo ao vigésimo sétimo somito (PLA; LARUE, 2003), apresenta duas rotas migratórias (Figura 4). A primeira onda migratória é a dorso-ventral sobre o esclerotoma, dando origem aos gânglios da raiz dorsal (quando não atravessam completamente o esclerotoma) ou aos gânglios parassimpáticos, medula adrenal a inervação da aorta (quando atravessam completamente o esclerotoma) (LE LIEVRE; LE DOUARIN, 1975; GILBERT, 2003). A CN deste domínio pode ainda, em uma segunda onda migratória, tomar uma rota

dorso-lateral, entre a derme e a epiderme, se instalando sob o ectoderma, dando origem aos melanócitos (ERICKSON; GOINS, 1995).

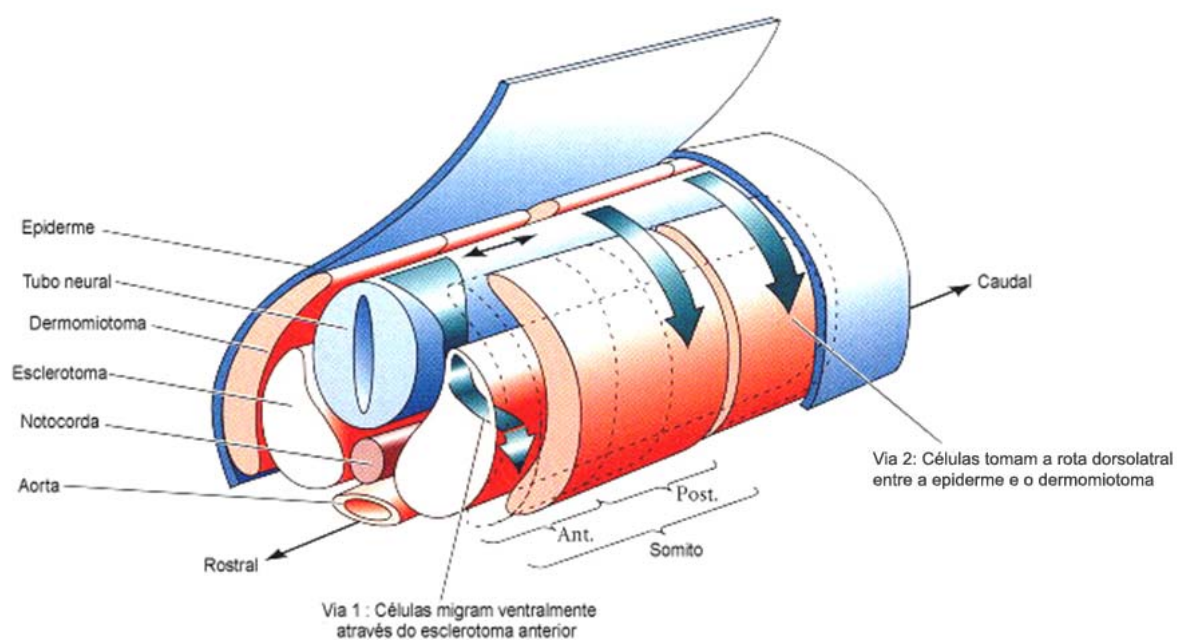


Figura 4. Diagrama esquemático das rotas migratórias na CN truncal (GILBERT, 2003).

1.2. Diferenciação celular

De maneira geral diferenciação celular pode ser definido como um processo pelo qual uma célula progenitora adquire um novo fenótipo que permite a execução de atividades específicas, sendo este processo acompanhado pela ativação de grupos específicos de genes e inativação de outros.

1.3. Morte Celular

O fenômeno de morte celular, além de ser uma característica importante no desenvolvimento, parece também ser causa de muitas doenças, como por exemplo as neurodegenerativas (MATTSON, 2000).

A morte celular excitotóxica pode ser tanto necrótica quanto apoptótica (BONFOCO *et al.*, 1995; MATTSON, 2000). A necrose envolve rápido inchaço celular e é caracterizada por perda da integridade da membrana celular, resultando em perda de íons potássio, entrada de íons sódio e queda do potencial de membrana, redução no metabolismo energético com diminuição dos níveis de ATP, diminuição da síntese de macromoléculas, destruição de mitocôndria e de outras organelas até o rompimento da membrana e extravasamento no conteúdo intracelular (SASTRY; RAO, 2000).

A morte celular por apoptose é uma resposta programada, lenta em curso de tempo e envolve retração celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (CLARKE, 1990), sem diminuição de níveis de ATP (MATTSON, 2000). A apoptose pode ser ativada por sinais intrínsecos ou extrínsecos. Dentre as características bioquímicas encontradas na apoptose ativada por sinais intrínsecos pode-se citar a translocação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax e Bad) do citosol para a mitocôndria e liberação do citocromo C para o citosol. A presença do citocromo no citosol leva à ativação de enzimas denominadas caspases (cisteína-proteases) (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; MATTSON, 2000). Já a ativação da apoptose por sinais extrínsecos envolve a participação de receptores de membrana, como por exemplo o receptor Fas (CD95), que interage com domínios de morte celular de uma proteína associada ao Fas, levando a ativação da caspase 8, que por sua vez ativa as caspases 3 e 7 (ZHANG; HERMAN, 2002). A ativação de uma cascata de caspases

pode então ativar DNAses que são responsáveis pela clivagem do DNA em fragmentos internucleossomais (NAGATA, 2000).

Um dos mecanismos que controlam a apoptose em miofibroblastos envolve a degradação proteolítica de Fibronectina (FN), sendo este processo seguido pela perda de adesões focais a esta proteína extracelular (LESKINEN *et al.*, 2003). A cinase de adesão focal, um dos mediadores das adesões focais e sobrevivência de miofibroblastos, é rapidamente degradada na presença de produtos de degradação da FN. Neste processo, mediadores regulados pela cinase de adesão focal de sobrevivência são inativados por desfosforilação, desencadeando o processo de morte celular por apoptose (LESKINEN *et al.*, 2003).

1.4. Proteínas da matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) corresponde a um complexo multifuncional de proteínas, como FN, laminina (LN), colágeno (CL) e tenacina e proteoglicanas, como hialuranana, decorina, perlecana e agrecana. Estes componentes são dispostos de maneira altamente organizada, propiciando integridade estrutural à maioria das células em organismos vivos (VENSTROM; REICHARDT, 1993; TANZER, 2006) (Figura 4).

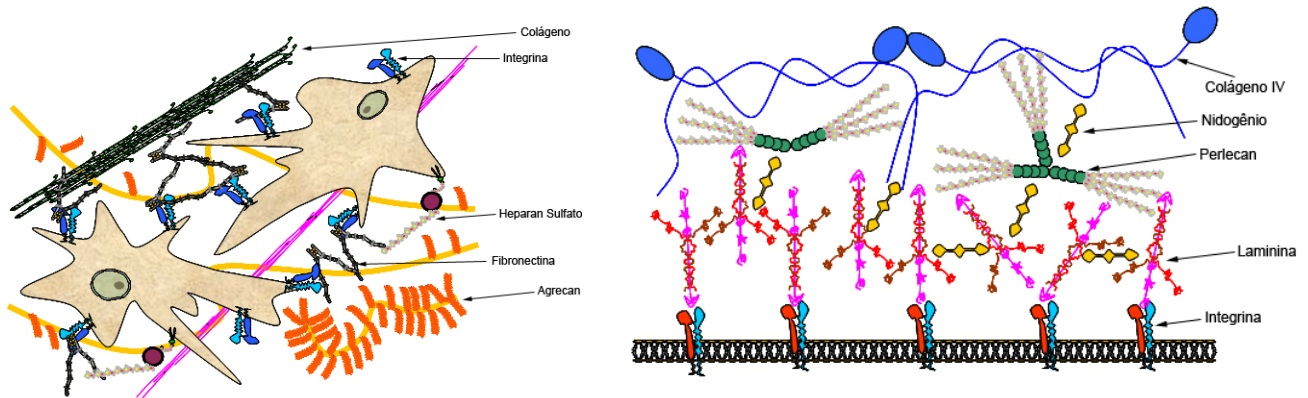


Figura 5. Organização dos complexos multifuncionais de proteínas e proteoglicanos da matriz extracelular (STEVE, 2007).

Os principais mediadores dos efeitos da MEC sobre as células são os receptores de adesão do tipo integrinas. As integrinas são moléculas transmembranares compostas por duas subunidades de glicoproteínas denominadas α e β , associadas não covalentemente (Figura 6) que quando ativadas iniciam diversas sinalizações intracelulares, podendo ativar uma variedade de tirosina cinases e GTPases (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999; GIANCOTTI; TARONE, 2003), resultando na regulação de propriedades celulares como adesão, migração, proliferação, expressão gênica, morfologia, sobrevivência e diferenciação (SECHLER; SCHWARZBAUER, 1998; SERINI *et al.*, 1998; WU *et al.*, 1998; NAGEL; WINKLBAUER, 1999; SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999; STREULI, 1999; PESHEVA; PROBSTMEIER, 2000; TAKANO *et al.*, 2002; TANZER, 2006). Além disto, sinais provenientes de integrinas são capazes de regular sinais gerados por fatores de crescimento (FFRENCH-CONSTANT; COLOGNATO, 2004).

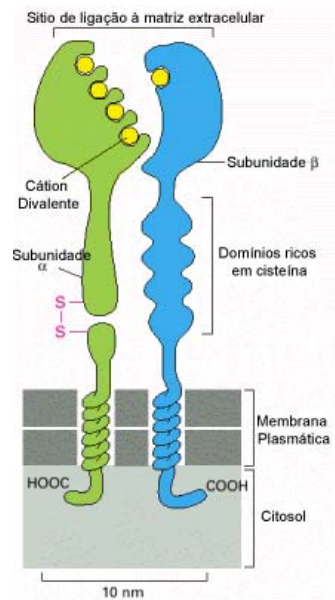


Figura 6. Estrutura em subunidades de um receptor de membrana do tipo integrina (ALBERTS, 2002).

1.4.1. Lamininas

Depois dos CLs a LN é o componente mais abundante da MEC. A LN é uma glicoproteína heterodimérica em forma de cruz de aproximadamente 70 nanômetros de comprimento, formada por uma cadeia α de 400 Kilo Daltons (KDa) e por duas cadeias (β e γ), de aproximadamente 215KDa e 205KDa, respectivamente (HYNES, 1987; FARWELL; TRANTER; LEONARD, 1995; NGUYEN; SENIOR, 2006) (Figura 6). As cadeias α são consideradas a porção funcionalmente ativa da molécula devido ao fato de carregarem os principais domínios de interação com receptores celulares (HALLMANN *et al.*, 2005). Através da combinação das 5 formas de cadeia α , 4 de β e 3 de γ a LN pode se apresentar em 15 isoformas diferentes (COLOGNATO; WINKELMANN; YURCHENCO, 1999; SASAKI; FASSLER; HOHENESTER, 2004).

A regionalização das moléculas de LN na MEC é determinada pelos contatos focais, que são complexos macromoleculares formados pelo agrupamento de integrinas a microfilamentos de actina (REICHARDT; TOMASELLI, 1991; FARWELL; TRANTER; LEONARD, 1995; NGUYEN; SENIOR, 2006).

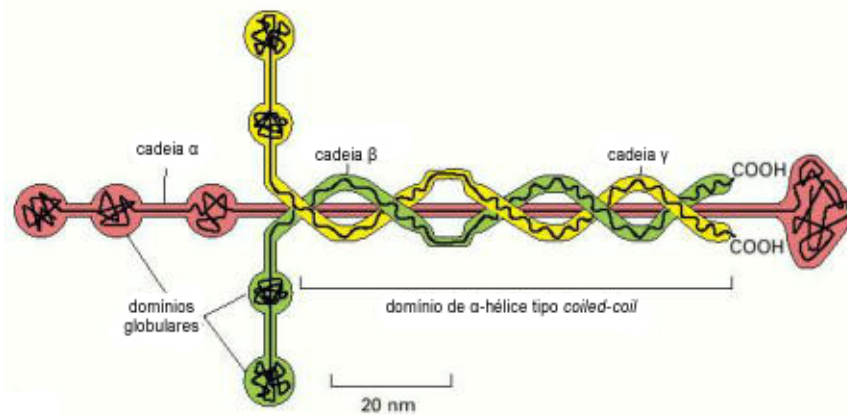


Figura 7. Estrutura da laminina (ALBERTS, 2002).

1.4.2. Fibronectina

A FN é uma glicoproteína multifuncional encontrada na MEC, composta de duas subunidades unidas por pontes dissulfeto, próximas às extremidades C-terminais (Figura 8). Apresenta domínios específicos para ligação com outras proteínas da MEC, para glicosaminoglicanos e mais de doze tipos de heterodímeros de integrinas (sítios de ligação à célula) (DARRIBERE *et al.*, 2000; ZAGRIS, 2001). No sítio de ligação à célula, a sequência Arginina-Glicina-Asparagina (RGD) possui papel crucial no processo de adesão celular (Figura 8), promovendo ligação com integrinas e permitindo assim processos de migração e espalhamento celular (OBARA; YOSHIZATO, 1995; MOULD *et al.*, 1997; MILNER, 2007).

O sítio RGD é encontrado em diversos ligantes que interagem com integrinas incluindo FN, vitronectina, CL e uma variedade de outras proteínas adesivas (CARDARELLI *et al.*, 1992). Mesmo sendo uma pequena seqüência peptídica, experimentos utilizando RGD sintético demonstram que este peptídeo é capaz de, por inibição competitiva, afetar a ligação integrina-FN (TAKANO *et al.*, 2002). Seqüências RGD são reconhecidas por diversos membros da família das integrinas como $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$. Cada integrina, entretanto, reconhece especificamente seu próprio grupo de moléculas da MEC, indicando que ligações fortes requerem mais do que apenas a seqüência RGD (ALBERTS, 2002).

A molécula de FN possui ainda em seu domínio C-terminal, duas regiões de ligação à heparina, onde a seqüência PPRR medeia a ligação celular à sindecana 4. A interação celular com domínios de ligação de heparina é essencial para a formação de estruturas de adesão estáveis, incluindo contatos focais (WOODS *et al.*, 2000).

A FN pode exercer efeitos importantes sobre funções celulares como proliferação (SECHLER; SCHWARZBAUER, 1998; SOTTILE; HOCKING; SWIATEK, 1998). Em experimentos onde se promoveu a desorganização da matriz de FN, houve redução na atividade de ciclina E-cdk2, o que afetou diretamente a progressão do ciclo celular (BOURDOULOUS *et al.*, 1998). A ação conjunta de FN com fatores de crescimento podem ainda regular processos de diferenciação (SERINI *et al.*, 1998) e migração celular (NAGEL; WINKLBAUER, 1999).

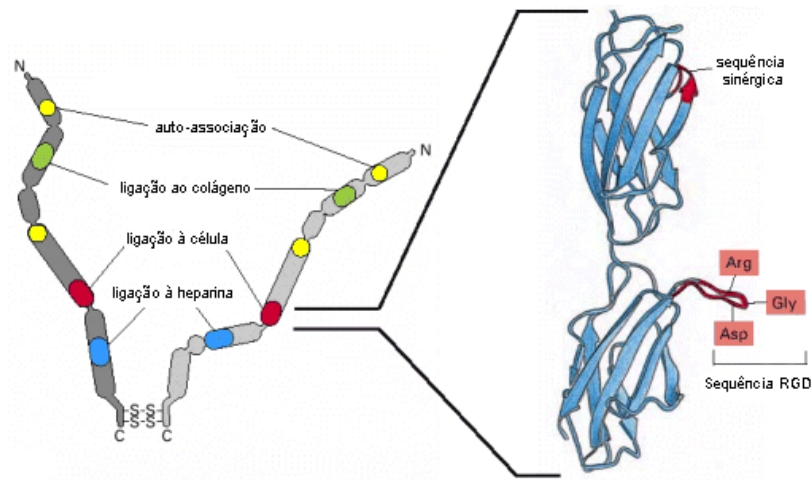


Figura 8. Estrutura da fibronectina com o sítio RGD de ligação à célula (ALBERTS, 2002).

1.4.3. Colágenos

Os CLs correspondem a uma família moléculas de MEC que exercem como principal papel, a manutenção da integridade estrutural de órgãos e tecidos. As funções dos CLs podem ser ilustradas pela variedade de manifestações clínicas provenientes de mutações em quaisquer dos vinte e dois genes para dentro os mais de vinte tipos de CL conhecidos. As conseqüências destas mutações vão de fenótipos letais precoces à predisposição a certos tipos de doença (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001). Os CLs também possuem papel importante na cicatrização de ferimentos e recuperação de fraturas, havendo retardo destes processos em casos onde a sua produção é afetada. Por outro lado, a superprodução de CLs, pode levar a fibroses de tecidos e órgãos (KIVIRIKKO, 1993).

Os CLs podem ser classificados em 19 tipos (KIVIRIKKO, 1993; BROWN; TIMPL, 1995; KADLER, 1995; OLSEN, 1995; PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995), sendo que mais de quinze proteínas possuem domínios semelhantes à CL (PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995; SRIVASTAVA *et al.*, 1997; BECK; BRODSKY, 1998; KIVIRIKKO;

PIHLAJANIEMI, 1998; CHUNG; AU; HUANG, 1999; EZER *et al.*, 1999; KRAAL *et al.*, 2000). Todos os CLs consistem de três cadeias polipeptídicas, as cadeias α , que são empacotadas umas sobre as outras em uma estrutura em tripla hélice. Em alguns tipos de CLs as três cadeias α são idênticas, enquanto que em outros há a presença de dois ou até três tipos diferentes. Nestas cadeias todo o terceiro aminoácido é uma glicina, podendo a seqüência ser expressa como (glicina – X – Y) $_n$, onde X e Y representam aminoácidos diferentes de glicina (X e Y são freqüentemente prolina e Y 4-hidroxiprolina, respectivamente) e n variações de acordo com o tipo e domínio de CL. Por razões de organização espacial das cadeias de CL, a presença de glicina, o menor dos aminoácidos, se faz essencial para que se possa dar o entrelaçamento das 3 cadeias α (figura 9). (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001).

Dentre os diversos tipos de CLs, o do tipo IV (CL IV) se destaca por ser o componente estrutural mais importante das membranas basais, integrando LNs, nidogênios e outros componentes em um agregado supramolecular estável. A estrutura do CL IV é caracterizada por três domínios: o N-terminal 7S, o C-terminal globular e a tripla hélice central. Já foram identificadas 6 cadeias de subunidades, $\alpha 1(IV)$ à $\alpha 6(IV)$, associando-se em três moléculas heterodiméricas distintas. A forma predominante é a de heterodímeros $\alpha 1(IV)2\alpha 2(IV)$, que formam redes na maioria das membranas basais tanto de embriões quanto de adultos (HUDSON; REEDERS; TRYGGVASON, 1993). Já as isoformas $\alpha 3(IV)$ - $\alpha 6(IV)$ apresentam-se restritas a alguns tecidos, e formam também heterodímeros independentes em uma rede homotípica de $\alpha 3(IV)\alpha 4(IV)\alpha 6(IV)$, sendo restritas aos rins e pulmões (BORZA *et al.*, 2001).

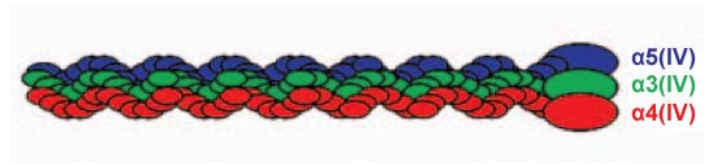


Figura 9. Estrutura em tripla hélice do colágeno IV (TORRA *et al.*, 2004).

1.5. Papel da interação célula-MEC no desenvolvimento

De maneira geral, a resposta biológica à MEC envolve múltiplas interações das células com moléculas individuais de MEC em seus diversos sítios. Os efeitos da MEC nos processos celulares são mediados por receptores de superfície celular (BOKEL; BROWN, 2002). Receptores de diversas naturezas participam do processo de transdução de sinal da MEC para o citoplasma e núcleo da célula. Dentre estes, pode-se mencionar as integrinas, receptores tipo tirosina cinase e fosfatase, receptores da superfamília das imunoglobulinas, distroglicanas e proteoglicanas (SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999; KUCHENBAUER *et al.*, 2001; SCHWARTZ, 2001; HOFFMAN *et al.*, 2002; KLEINMAN; PHILP; HOFFMAN, 2003). Outro aspecto importante neste processo é o fato da maioria das MECs que produzem efeito biológico, onde se incluem LNs, CLs, trombosporinas e FN, possuir múltiplos sítios ativos, comumente heterogêneos quanto às atividades e interações com receptores (KLEINMAN; PHILP; HOFFMAN, 2003).

A importância da MEC no desenvolvimento tem sido demonstrada em estudos *in vivo* utilizando a deleção de genes (GUSTAFSSON; FASSLER, 2000). Camundongos que não possuem genes codificadores para certos componentes da MEC normalmente morrem antes do nascimento. A membrana basal, um componente crítico para as fases iniciais do desenvolvimento, principalmente por estar envolvida na manutenção da

arquitetura de tecidos e fornecer substrato para processos de migração e morfogênese, é composta por LN, CL IV, perlecana, entactina/nidogênio e diversos tipos de fatores de crescimento (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; SHIMIZU *et al.*, 2002; KRAMEROVA; KRAMEROV; FESSLER, 2003). No estágio de duas células, a primeira MEC sintetizada (cadeia $\gamma 1$ de LN) serve de suporte inicial para o desenvolvimento. Camundongos que não expressam o gene para a cadeia $\gamma 1$ de LN não conseguem organizar a membrana basal adequadamente e morrem normalmente no quinto dia do desenvolvimento embrionário (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; GUSTAFSSON; FASSLER, 2000; LI *et al.*, 2002; SHIMIZU *et al.*, 2002; KRAMEROVA; KRAMEROV; FESSLER, 2003). Outro exemplo é o de camundongos que não expressam o gene para a cadeia $\alpha 2$ de LN, que possuem fenótipo semelhante ao de animais com distrofia muscular. A maioria dos casos de distrofia muscular humana está associada a mutações ou perda da cadeia $\alpha 2$ de LN. É admissível que novas doenças genéticas relacionadas a alterações em componentes da MEC ainda sejam descobertas (KLEINMAN; PHILP; HOFFMAN, 2003).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a MEC e fatores de crescimento regulam a diferenciação de células tronco. Um exemplo disto é observado em culturas de células tronco embrionárias, onde uma membrana basal composta por LN tipo 1, CL IV, perlecana, entactina e fatores de crescimento em um meio condicionado de fibroblastos, é capaz de suprir a necessidade do uso de monocamadas alimentadoras de fibroblasto (usualmente essencial para a manutenção de células tronco embrionárias em cultura) (XU *et al.*, 2001). Outro exemplo é o de culturas de células tronco de blastocisto de macacos, que na presença de matrigel (preparação rica em LN, CL IV, proteoglicana de sulfato de heparana e entactina) se diferenciam em estruturas

semelhantes à glândula e na presença de MEC de extrato de cartilagem se diferenciam em condrócitos (KLEINMAN; PHILP; HOFFMAN, 2003).

1.5.1. Papel da interação célula-MEC no desenvolvimento da CN

Para seu processo de migração celular, a CN requer mudanças nas interações célula-célula, célula-MEC e reorganização da MEC. A CN migra através da lâmina basal em formação, que só se estrutura de forma permanente após a completa emigração da CN. Durante este processo proteínas da MEC como FN, CL I, CL IV, LN e tenascina encontram-se distribuídas lateralmente ao tubo neural e são tidas como facilitadoras da migração da CN (LE DOUARIN, 1999). A migração da CN nestas MECs se dá principalmente por interações envolvendo integrinas das sub-famílias $\beta 1$ e $\beta 3$ (DELANNET *et al.*, 1994; DESBAN; DUBAND, 1997; KIL *et al.*, 1998), entretanto acredita-se que diversas outras famílias de integrinas também estejam envolvidas neste processo (ALFANDARI *et al.*, 2003). Por outro lado, moléculas não permissivas como agrecana, versicana (PERRIS *et al.*, 1991; LANDOLT *et al.*, 1995; PERRIS *et al.*, 1996) e CL IX (RING; HASSELL; HALFTER, 1996) estão presentes em regiões onde não é observada a migração da CN, atuando como verdadeiras barreiras.

Uma característica particular do desenvolvimento da CN é a geração de diferentes grupos de derivados fenotípicos, dependendo da localização antero-posterior no embrião, especialmente quanto a geração dos derivados mesenquimais cartilagem, ossos e musculatura lisa, exclusiva da região cefálica. Diferenças regionais dos destinos fenotípicos da CN parecem ser determinados em parte por sinais que atuam após o processo de migração celular (DARLAND; LEBLANC, 1996; LE DOUARIN, 1999). Tem sido relatado que a MEC promove a diferenciação da CN em determinados

fenótipos in vivo, entretando os mecanismos pelos quais tais processos ocorrem permanecem pouco conhecidos (LORING; GLIMELIUS; WESTON, 1982; ROGERS; BERNARD; WESTON, 1990; TAKANO *et al.*, 2002).

Apesar da abundância de estudos abordando a distribuição da MEC ao longo das rotas migratórias da CN, é ainda pouco compreendido o papel destas moléculas em processos como de proliferação, diferenciação e morte celular da CN. Considerando a relação existente entre a rota migratória e os destinos fenotípicos da CN, surge uma questão fundamental: a especificação das células da CN ocorre quando estas entram em contato com fatores locais após a passagem por rotas migratórias específicas ou este processo se dá por um programa celular pré-estabelecido que determina a responsividade destas células a fatores microambientais durante o processo de migração?

Neste trabalho buscou-se investigar os efeitos de diferentes componentes da MEC (LN, FN, CL IV) no desenvolvimento dos derivados da CN. Tal estudo visa fornecer dados adicionais quanto aos componentes ambientais que possam estar influenciando processos como migração, proliferação, morte e diferenciação da CN, de forma a interferir em sua morfogênese.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar o papel da matriz extracelular na morfogênese das células da crista neural cefálica de camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito de Colágeno tipo IV, Fibronectina e Laminina na migração, proliferação e morte celular da crista neural cefálica de camundongos;
2. Avaliar o efeito de Colágeno tipo IV, Fibronectina e Laminina na diferenciação da crista neural em células gliais, neurônios e miofibroblastos;
3. Reconhecer os mecanismos envolvidos nos efeitos da matriz extracelular sobre as células da crista neural.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

3-3'-5 triiodo-L-tironina (T₃), 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI), anticorpo murino tipo Imunoglobulina (Ig)G1 anti- β tubulina III, anticorpo murino tipo IgG2a anti-actina de músculo liso (SMA), anticorpo secundário anti-IgG cunicular conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), anticorpo secundário anti-IgG1 murina conjugado a vermelho do texas (TxRd), anticorpo secundário anti-IgG2a (IgG2a) murina conjugado a vermelho do texas (TxRd), estreptomicina, fator de crescimento de epiderme (EGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), glucagon, hidrocortisona, insulina, penicilina, transferrina, tripsina, triton X100 e tween 20 foram adquiridos da Sigma.

5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) foi adquirido da Invitrogen.

Ácido clorídrico foi adquirido da F. Maia.

Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi adquirido da Vetec

Anticorpo cunicular anti-IgG1 murina conjugado FITC da Santa Cruz.

Anticorpo cunicular tipo Ig G anti-proteína fibrilar ácida de células gliais (GFAP) foi adquirido da Dako.

Anticorpo murino anti-5-bromo-2'-deoxiuridina foi adquirido da Calbiochem.

Anticorpo murino tipo Ig G1 anti-beta tubulina III foi adquirida da Promega.

Cloreto de potássio e fosfato de potássio foram adquiridos da Reagen.

Cloreto de sódio foi adquirido da Dinâmica.

Colágeno tipo IV, fibronectina, laminina e meio mínimo essencial modificado alfa (α -MEM) foram adquiridos da Gibco.

Fosfato de sódio dibásico foi adquirido da Synth.

Glicerina foi adquirida da Merck.

Paraformaldeído (PF) foi adquirido da Vetec.

Placas de cultura de 35 milímetros e de 96 poços foram adquiridos da Corning.

Soro Fetal Bovino (SFB) foi adquirido da Cultlab.

3.1.2. Equipamentos

Centrífuga, Excelsa baby – FANEM.

Centrífuga, 5415 D – Eppendorf.

Estufa úmida de CO₂, Revco

Fluxo laminar, Veeco.

Materiais cirúrgicos, Petrovitsh.

Microscópio de contraste de fase, Olympus.

Microscópio estereoscópico, Olympus.

Microscópio epifluorescente, Olympus.

Software Universal Desktop Ruler, AVPSOft.

Software Graphpad Prism, Graphpad Software Incorporation.

3.2. Animais

Foram utilizados embriões de 8,5 dias de camundongos da linhagem C57BL/6. A meia noite (0 hora) anterior à presença do tampão vaginal foi estabelecida teoricamente como o dia embrionário zero. Seus genitores foram criados no biotério setorial do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da Universidade

Federal de Santa Catarina, sendo mantidos em ambiente climatizado de 23-26° C, com ciclo de claro/escuro de 12 horas, dispondo de água e ração *ad libitum* (ITO; MORITA, 1995). A utilização dos animais está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC, em 03 de junho de 2005, sob o protocolo de pesquisa/ensino número 338/CEUA e 23080.007342/2005-26/UFSC

3.3. Cultura de células

3.3.1. Culturas primárias

Culturas primárias de células da CN cefálica de camundongos foram preparadas utilizando metodologia descrita por Ito e colaboradores (1995), com modificações desenvolvidas em nosso laboratório. Os embriões foram removidos do útero pela utilização de pinças metálicas, sob observação em microscópio estereoscópico. Os embriões foram colocados em placa de Petri contendo solução salina tamponada por fosfato (PBS) (Anexo I) e as pregas neurais foram então removidas com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio. As pregas neurais foram colocadas sobre placas de cultura de 35 milímetros de diâmetro, previamente revestidas com CL IV murino, FN de plasma humano ou LN murina. Em todos os casos as proteínas foram dissolvidas em água na concentração de 20µg/mL, sendo incubadas à temperatura ambiente por 45 minutos (para LN e FN) ou 3 horas (para CL IV), de acordo com especificações do fabricante. Após um período de 24 horas, as pregas neurais e seus componentes epiteliais foram removidos mecanicamente, com o auxílio de agulhas entomológicas de

tungstênio, tendo deixado-as aderidas à placa de cultura apenas as células da CN que emigraram do explante (Figura 10). As culturas foram mantidas por 1, 3, 6, 9 ou 12 dias em estufa úmida contendo 5% de CO₂ e a 37° C, com troca de meio a cada 3 dias.

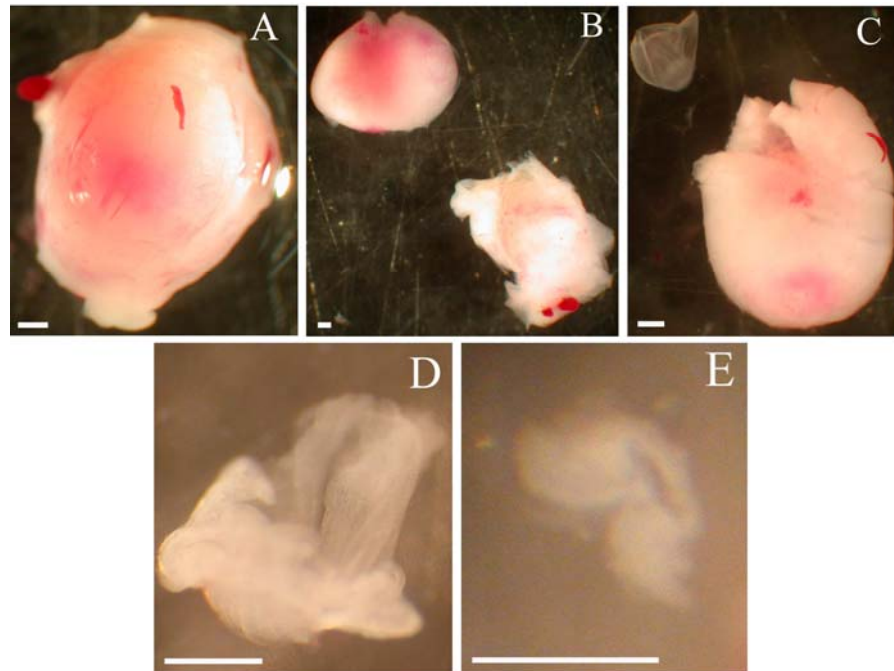


Figura 10. Procedimento cirúrgico para a remoção do embrião de camundongo de 8,5 dias e do tubo neural. (A) Útero (B) Membranas extraembrionárias e útero. (C) Âmnion com embrião e membranas extraembrionárias. (D) Embrião. (E) Porção da região cefálica. Barra = 450µm

3.3.2. Culturas secundárias

Para a realização das culturas secundárias, foram utilizadas culturas primárias de 48 horas. As pregas neurais foram removidas como descrito acima para as culturas de 24 horas. O meio de cultura foi aspirado, a cultura foi lavada três vezes com PBS e em seguida foi adicionada solução Tripsina-EDTA por 30 segundos. A reação foi bloqueada pela adição de α MEM contendo 10% de SFB. As células foram então

centrifugadas (5 minutos, 2000 rpm), re-suspensas em meio complexo (vide item 3.3.3.) e semeadas em placas revestidas com CL IV ou FN como descrito acima.

3.3.3. Meio de Cultura

As células foram cultivadas em meio complexo (LAHAV *et al.*, 1998; TRENTIN *et al.*, 2004) contendo 88% de α -MEM, 10% de SFB, 2% de extrato de embrião de galinha (Anexo II), hidrocortisona (0,1 μ g/mL), transferrina (10 μ g/mL), insulina (1ng/mL), T₃ (0,4ng/mL), glucagon (0,01ng/mL), EGF (0,1ng/mL), FGF (0,2ng/mL), penicilina (200 U/mL) e estreptomicina (10 μ g/mL).

3.4. Avaliação da migração celular

A migração das células da CN a partir das pregas neurais foi obtida pela medida do halo de migração, descontado o valor da área das pregas neurais (Área migração = Área total das células migradas com o explante – Área do explante) (HUANG *et al.*, 1998), calculados pelo software Universal Desktop Ruler.

3.5. Imunocitoquímica

A presença de marcadores de fenótipos celulares foi avaliada como previamente descrito (LAHAV *et al.*, 1998; DUPIN *et al.*, 2000; TRENTIN *et al.*, 2003; TRENTIN *et al.*, 2004). As monocamadas foram fixadas com 4% de Paraformaldeído por 20 minutos à temperatura ambiente e as membranas celulares permeabilizadas com PBS contendo 0,2 % de Triton X100 (PBS-Triton) por 20 minutos. Os sítios inespecíficos de

ligação dos anticorpos foram bloqueados pela incubação com 10% de SFB diluído em PBS por 1 hora.

Após os passos de fixação, permeabilização e bloqueio, foram realizadas reações de imunocitoquímica utilizando-se anticorpos primários específicos para marcadores de células gliais (anti-GFAP, policlonal, 1:250), de neurônios (anti- β Tubulina III monoclonal, 1:2000) e de miofibroblastos (anti-SMA monoclonal, 1:300). A incubação com os anticorpos primários foi realizada por um período de 1 hora a 37°C. A seguir procedeu-se às lavagens (3 lavagens de 5 minutos sob leve agitação com solução de PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 - PBS-Tween) e à nova incubação (1 hora, a temperatura ambiente) com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado à FITC (1:80), anti-IgG1 de camundongo conjugado à TxRd (1:75) e anti-IgG2a de camundongo conjugado à TxRd (1:100). Após 3 novas lavagens com PBS-Tween, as células foram incubadas com DAPI (50ng/mL) por 15 segundos, à temperatura ambiente, para análise do número total de células. As placas de cultura foram recobertas com solução de glicerina em tampão carbonato-bicarbonato a pH 9,0 (glicerina tamponada). As células foram observadas e fotografadas em microscópio epifluorescente.

3.6. Avaliação da Morte Celular por Apoptose

Os eventos que caracterizam a apoptose foram avaliados pela fragmentação da cromatina, através da utilização do corante DAPI que permite a visualização nuclear (VILLEGAS *et al.*, 2006). As células foram cultivadas em placas de cultura como descrito acima durante 6 ou 12 dias. As células foram fixadas e coradas com DAPI,

como descrito no item 3.5.1 e observadas em microscópio epifluorescente. Do total de núcleos contados foi determinado o número de núcleos apoptóticos (Figura 15) para quantificar a porcentagem de células em processo de morte celular.

3.7. Avaliação da Proliferação celular por incorporação com BrdU

A proliferação foi avaliada por ensaio de incorporação BrdU, padronizada em nosso laboratório. Após 0, 2, 5 ou 8 dias de cultura, as células foram incubadas por 24 horas com BrdU (diluição 1:100) e a seguir fixadas e permeabilizadas como descrito acima. As células foram então lavadas com água destilada e incubadas com 2N de ácido clorídrico por 15 minutos, à 37° C. As culturas foram novamente lavadas com PBS e procedeu-se à reação de imunocitoquímica descrita no item 3.5.1 utilizando-se o anticorpo primário murino anti-BrdU (diluição 1:500) e o anticorpo secundário cunicular anti-IgG1 murina conjugado a FITC. Os núcleos foram corados com DAPI para análise do número total de células.

3.8. Ensaio de Inibição por GRGDS

Para esse ensaio foram utilizadas culturas secundárias preparadas em substrato de FN. Após 12 horas de cultivo, o peptídeo de glicina-arginina-glicina-asparagina-serina (GRGDS) foi acrescentado ao meio nas concentrações de 0, 250 ou 350 µg/mL. O meio contendo GRGDS foi substituído a cada 3 dias. As células imunomarcadas para SMA foram quantificadas no décimo dia de cultura secundária.

3.9. Análise Estatística

A significância das diferenças foi avaliada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de múltipla comparação de Bonferroni, quando necessário, pelo programa Graphpad Prism. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5. Discussão

No presente estudo pode-se demonstrar que a MEC exerce um importante papel não apenas na migração, como já mencionado na literatura (DUBAND; THIERY, 1987; TAN *et al.*, 1987; BRONNER-FRASER, 1988; NEWGREEN, 1989; PERRIS *et al.*, 1991; ERICKSON; DUONG; TOSNEY, 1992; PERRIS *et al.*, 1993a; PERRIS *et al.*, 1993b; DELANNET *et al.*, 1994; LANDOLT *et al.*, 1995; PERRIS *et al.*, 1996; RING; HASSELL; HALFTER, 1996; DESBAN; DUBAND, 1997; KIL *et al.*, 1998; LE DOUARIN, 1999; SCHAUMBURG-LEVER *et al.*, 2000; ALFANDARI *et al.*, 2003), mas também na proliferação e diferenciação das células da CN.

Os resultados obtidos demonstraram que a FN é capaz de favorecer a diferenciação das células da CN em miofibroblastos após a fase inicial de migração a partir das pregas neurais. Esse efeito envolve, ao menos parcialmente, as interações de sítios RGD de FN com as integrinas destas células. Tal processo leva a uma maior expressão do fenótipo de miofibroblastos sobre FN quando comparado com as outras proteínas da MEC estudadas (LN e CL IV).

5.1. Efeito diferencial da matriz extracelular na migração das células da crista neural cefálica

A maior migração da CN sobre FN e CL IV quando comparadas com LN observada em nossos resultados, pode ser explicada pela diferença do perfil de expressão de moléculas de adesão envolvidas na interação CN-MEC (principalmente α integrinas) (AUMAILLEY; KRIEG, 1996; ALFANDARI *et al.*, 2003; COLES *et al.*, 2006). Outra possibilidade seria a modulação dos níveis de integrinas na superfície destas células por processos de internalização e/ou reciclagem de uma forma substrato-

dependente (STRACHAN; CONDIC, 2004). Estes resultados podem ainda ser relacionados aos previamente descritos em CN de aves, onde se estudou a migração das células da CN sobre FN e LN *in vitro*. Nestes experimentos foi observado que a MEC é capaz de modificar os níveis de integrinas por alterações pós-traducionais, influenciando consequentemente na velocidade de migração das células de uma maneira substrato-dependente (STRACHAN; CONDIC, 2003).

5.2. Efeito da matriz extracelular na diferenciação e proliferação da crista neural cefálica

O modelo de CN tem sido freqüentemente utilizado no estudo do processo de diferenciação celular. Neste modelo, há uma relação direta entre rotas migratórias e destinos fenotípicos das células, sendo este processo instrutivo e presente tanto no momento da saída do tubo neural quanto durante e após a migração (CHRISTIANSEN; COLES; WILKINSON, 2000). Diversos elementos participam da orientação migratória das células da CN, exercendo papel permissivo, indutivo ou inibitório, influenciando assim os destinos fenotípicos destas células (ROBINSON *et al.*, 1997; PERRIS; PERISSINOTTO, 2000).

Grandes avanços têm sido feitos na identificação de sinais extracelulares e fatores de transcrição que influenciam a especificação e a diferenciação da CN (GREENWOOD; TURNER; ANDERSON, 1999; PISANO; BIRREN, 1999; WHITE; ANDERSON, 1999). Dentre as diversas classes de moléculas sinalizadoras e transdutoras de sinal pode-se destacar Wnt-1, Wnt-3a, endotelina 3, fator de crescimento de células tronco (SCF) e fibronectina na diferenciação de melanócitos (DORSKY; MOON; RAIBLE, 1998; TAKANO *et al.*, 2002), fator de crescimento de

neurônios, FGF, BMP-4, BMP-7 e BMP-2 na diferenciação de linhagens neuronais (REISSMANN *et al.*, 1996; VARLEY; MAXWELL, 1996; SCHNEIDER *et al.*, 1999; FORANDER; BROBERGER; STROMBERG, 2001), fator de crescimento de células gliais na diferenciação de células gliais (LEIMEROTH *et al.*, 2002), fator de crescimento transformador (TGF) na diferenciação de músculo liso (LI *et al.*, 2007) e Sonic Hedhog na diferenciação de cartilagem (BRITO; TEILLET; LE DOUARIN, 2006).

Um padrão marcante do desenvolvimento da CN é a produção de determinados derivados celulares de maneira região-específica ao longo do eixo antero-posterior do embrião. A região cefálica produz derivados ecto-mesenquimais, incluindo tecidos conjuntivos, cartilagem, miofibroblastos e ossos (DARLAND; LEBLANC, 1996), ao contrario do que ocorre na região truncal, onde não há produção de derivados mesenquimais (NAKAMURA; AYER-LE LIEVRE, 1982). Essas diferenças regionais dos fenótipos da CN parecem ser determinadas parcialmente por sinais presentes na fase pós-migratória (DARLAND; LEBLANC, 1996). Ensaios *in vitro* vêm demonstrando que a MEC promove e/ou permite a diferenciação da CN em determinados derivados celulares, sendo os mecanismos envolvidos ainda pouco conhecidos (LORING; GLIMELIUS; WESTON, 1982; ROGERS; BERNARD; WESTON, 1990; TAKANO *et al.*, 2002). Estudos em aves demonstraram o papel de FN, LN e CL na expressão de melanócitos e de células catecolaminérgicas (LORING; GLIMELIUS; WESTON, 1982; ROGERS; BERNARD; WESTON, 1990). Da mesma forma, em CN de camundongos foi demonstrado o papel de FN e do SCF na diferenciação, proliferação e migração de melanócitos (TAKANO *et al.*, 2002). No presente trabalho, foi demonstrado o papel instrutivo de FN sobre a diferenciação das células da CN em miofibroblastos, não sendo este fenômeno resultado de diferenças em processos de migração e morte celular. Os

resultados obtidos em conjunto sugerem que a proliferação celular parece não ser o principal fator a contribuir para a maior proporção de miofibroblastos sobre FN. O aumento do percentual de miofibroblastos em proliferação ao longo do período de cultura, parece ser resultado direto do incremento da população total proporcionada pela diferenciação destas células.

A deposição de FN por células da CN cefálica no início do processo de migração foi relatada em experimentos *in vivo*. Estas células encontram-se envolvidas por FN desde o momento de saída do tubo neural até a subsequente migração adentrando nos arcos branquiais (NEWGREEN; THIERY, 1980). Todavia não fica claro, por estas observações, se a FN é produzida pela CN cefálica ou por tecidos vizinhos. Leblanc (1994) demonstrou que a CN cefálica e a CN truncal diferem em seu padrão de expressão de FN durante o desenvolvimento *in vitro*. Observou-se que células da porção cefálica apresentam duas fases distintas na expressão de FN: uma primeira que ocorre durante o início da sua saída do explante em direção à placa de cultura e uma segunda que é associada ao período de diferenciação no desenvolvimento *in vitro*. Células imunomarcadas para FN representaram um dos tipos celulares mais abundantes nas culturas de CN cefálica, não sendo este perfil observado em derivados neuronais ou melanocíticos (LEBLANC, 1994). Esta observação permite sugerir a hipótese de que células da CN em um ambiente rico em FN apresentam-se comprometidas com a diferenciação em células da linhagem mesenquimal (como miofibroblastos).

Interessantemente, Newgreen e Thiery (1980) observaram em seus experimentos *in vitro* que a maior parte das células produtoras de FN apresentava uma morfologia achatada, e eram localizadas na periferia dos explantes de tubo neural. Tal

resultado sugere que as primeiras células a emigrarem do tubo neural são aquelas que apresentam elevada produção de FN. De fato foi possível observar no presente trabalho que a maior parte das células com esta morfologia e localização eram miofibroblastos (dado não demonstrado).

Os resultados obtidos neste trabalho permitem sugerir que a FN pode atuar como um fator autócrino que inicialmente é depositado pelas células da CN, fornecendo a estas um substrato para sua própria migração (NEWGREEN; THIERY, 1980), e em um segundo momento, em seu sítio final dentro do embrião, enviando sinais que levam à especificação em linhagens mesenquimais (como miofibroblastos). Esta hipótese é reforçada pela pequena quantidade de células imunomarcadas para FN em qualquer momento do desenvolvimento de culturas de CN truncal (LEBLANC, 1994). Este processo pode ser consequência da presença de elevados níveis de FN, provenientes de células vizinhas nas fases iniciais de migração dorso-ventral da CN, que pode sinalizar negativamente a produção dessa molécula da MEC pelas células da CN. Tal característica poderia levar à produção de um microambiente pouco propício ao desenvolvimento de derivados mesenquimais como condrócitos e miofibroblastos (fenótipos não observados *in vivo* na CN truncal).

Já é bem aceita a idéia de que o processo de diferenciação dos miofibroblastos é regulado por citocinas (como TGF- β e SCF) e moléculas de MEC (SHAH; GROVES; ANDERSON, 1996; SERINI *et al.*, 1998; DESMOULIERE; CHAPONNIER; GABBIANI, 2005). As células da CN interagem com diversos sítios de ligação de FN, incluindo o domínio RGD, através de integrinas que contribuem em processos de adesão, morfologia e migração celular (DUFOUR *et al.*, 1988). Além disto, vias de sinalização envolvendo integrinas têm sido relacionadas ao controle da proliferação e diferenciação

de células de músculo liso vascular (MORLA; MOGFORD, 2000). No presente trabalho foi demonstrado que o domínio RGD de FN está envolvido na especificação da CN em miofibroblasto, sugerindo que a interação FN/integrina possui um papel fundamental neste processo. Os resultados obtidos no presente trabalho são comparáveis ainda aos que demonstram o efeito de FN, por meio de seu sítio RGD, na diferenciação de células da CN em melanócitos (TAKANO *et al.*, 2002). Levando em conta resultados de culturas de células de músculo liso de artéria coronária suína apresentados por Morla e colaboradores (2000), onde se observou a ativação de cinases de adesão focal por FN, pode-se ainda sugerir que a ativação destas cinases possa apresentar relevância no efeito da FN sobre a expressão de miofibroblastos em culturas de CN.

As $\alpha 4$ integrinas, largamente expressas em células da CN em migração (PINCO; LIU; YANG, 2001), também têm sido correlacionadas pela literatura como importantes mediadoras dos efeitos da FN sobre a expressão de músculo liso. Estas moléculas encontram-se presentes em diversas fases do desenvolvimento de tecidos que contém derivados da CN como aorta (DUPLAA *et al.*, 1997), endotélio de vasos sanguíneos e mucosa do esôfago (SHEPPARD *et al.*, 1994), podendo ser outro potencial mediador dos efeitos da FN sobre a diferenciação da CN em miofibroblastos.

5.3. Considerações finais

Em todas as condições testadas, na análise feita no décimo segundo dia de cultura, constatou-se que entre 48 e 77% das células eram negativas para todos os fenótipos avaliados (Figura 13). Este processo pode resultar, em parte, da elevada proliferação de células não imunomarcadas para o fenótipo de miofibroblasto no sexto dia de cultura, que dentre outras podem corresponder a células tronco. Tal hipótese

poderia ser testada pelo uso de marcadores de progenitores multipotentes indiferenciados, como Slug, Snail, FoxD3 e HNK-1. Outra possibilidade é a de que parte destas células negativas correspondam a células gliais indiferenciadas que ainda não marcam para GFAP (um marcador de estágios intermediários/avançados de diferenciação deste fenótipo). De fato observou-se em experimentos pontuais, que no décimo segundo dia de cultura, entre 38 e 45% das células eram imunomarcadas para o receptor de baixa afinidade das neurotrofinas (p75) (dados não apresentados neste trabalho), sugerindo que partes das células não marcadas possam corresponder à CN indiferenciada (WONG *et al.*, 2006) ou células gliais jovens (KAMEDA, 2007). O uso de marcadores de células gliais pouco diferenciadas como a proteína glial zero (P0) permitiria a observação de uma maior proporção de células gliais em todas as condições avaliadas, especialmente se forem levados em consideração os resultados obtidos pela marcação de mielina de células de Schwann no modelo de codornas (COSTA, 2006).

Pode-se ainda considerar que dentre as células não marcadas possa haver células comprometidas com fenótipos não analisados neste trabalho. Tal hipótese poderia ser avaliada lançando-se mão de marcadores como TRP2 (melanócitos), S100 e O4 (células gliais imaturas), CL 2a1 (condrócitos) e Runx2 (osteócitos).

Em resumo, no presente trabalho demonstrou-se que o domínio RGD da FN está envolvido na diferenciação da CN cefálica de camundongos em miofibroblastos (Figura 13), sugerindo que a interação FN/integrina desempenha um papel fundamental neste processo, possivelmente por meio de mecanismos como ativação de cinases de adesão focal.

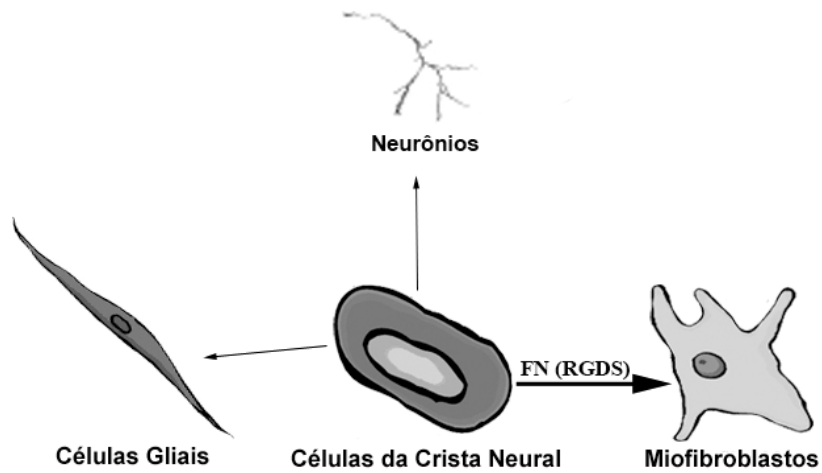


Figura 25. Efeito da FN sobre a diferenciação das células da CN em miofibroblastos. O efeito da FN na diferenciação das células da CN cefálica de camundongos é influenciado pelo sitio de ligação RGD da FN.

6. Conclusões:

Os substratos avaliados apresentaram diferentes efeitos sobre a migração de células da CN, sendo este processo menos pronunciado sobre LN do que sobre FN e CL IV.

Os substratos avaliados influenciaram a proliferação das células da CN, tendo sido a maior proliferação observada sobre o substrato de LN, seguida pela de FN e CL IV.

Dentre os substratos avaliados, a FN apresentou maior proporção do fenótipo de miofibroblastos, sendo este efeito resultado da ação deste substrato na fase pós-migratória.

Os baixos níveis observados de morte celular por apoptose em todos os substratos avaliados tornam este fenômeno pouco relevante na maior expressão de miofibroblastos sobre FN.

A maior expressão de miofibroblastos sobre FN se dá pelo efeito sobre a diferenciação de células da CN, tendo sido considerada a proliferação um fator menos importante neste processo.

A interação do sítio RGD de FN com integrinas participa do efeito deste substrato na diferenciação das células da CN em miofibroblastos.

7. Anexos

7.1. Anexo I

Solução Salina de fosfato Tamponada (PBS)

Adicionar a 1 litro de água destilada ou MilliQ 8g de Cloreto de Sódio (NaCl), 0,09g de Cloreto de Potássio (KCl), 3g de Fosfato de Sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,4 g de Fosfato de Potássio monobásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Verificar o pH que deverá estar em 7,4. Se estiver inferior ou superior ao desejado corrigir com solução de Hidróxido de sódio (NaOH) a 2N ou Ácido clorídrico (HCl) a 2N, respectivamente, até atingir o pH desejado.

7.2. Anexo II

Extrato de embrião

Incubar ovos fertilizados de galinha por um período de 11 a 14 dias a 37°C em incubadora úmida. Limpar a casca dos ovos cuidadosamente com etanol a 70%. Quebrar os ovos, depositando os embriões em placas de petri contendo PBS a 4°C (utilizar aproximadamente 7 mL de PBS para cada 3 embriões).

Remover os olhos dos embriões com a ajuda de uma tesoura. Macerar então os embriões com a ajuda de uma seringa de 20 mL, passando-os diretamente para um tubo de centrífuga estéril de 50 mL (10 embriões por tubo). Adicionar ao tubo volume equivalente de meio de cultura Alpha-MEM, passando todo o conteúdo do tubo novamente por uma seringa de 20 mL.

Centrifugar o tubo de 50 mL à 2000 rcf, à 7°C, por 10 minutos.

Filtrar o sobrenadante inicialmente em um pré-filtro de 0,8 μm , passando posteriormente por uma membrana de 0,45 μm .

8. Referências bibliográficas

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell** (4th ed.). New York: Garland Science. 2002, xxxiv, 1463, [86] p.

ALFANDARI, D.; COUSIN, H.; GAULTIER, A.; HOFFSTROM, B. G.; DESIMONE, D. W. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin. **Dev Biol**, v. 260, n. 2, p. 449-64, 2003.

AUMAILLEY, M.; KRIEG, T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. **J Invest Dermatol**, v. 106, n. 2, p. 209-14, 1996.

BECK, K.; BRODSKY, B. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil. **J Struct Biol**, v. 122, n. 1-2, p. 17-29, 1998.

BELL, C. D. Symmetry applied to nuclear microanatomy: a review of gene function and cell differentiation. **Histol Histopathol**, v. 19, n. 1, p. 291-8, 2004.

BHARTI, K.; NGUYEN, M. T.; SKUNTZ, S.; BERTUZZI, S.; ARNHEITER, H. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. **Pigment Cell Res**, v. 19, n. 5, p. 380-94, 2006.

BLAIR, J. E.; HEDGES, S. B. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. **Mol Biol Evol**, v. 22, n. 11, p. 2275-84, 2005.

BOCKMAN, D. E.; KIRBY, M. L. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. **Science**, v. 223, n. 4635, p. 498-500, 1984.

BOKEL, C.; BROWN, N. H. Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. **Dev Cell**, v. 3, n. 3, p. 311-21, 2002.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 16, p. 7162-6, 1995.

BORZA, D. B.; BONDAR, O.; NINOMIYA, Y.; SADO, Y.; NAITO, I.; TODD, P.; HUDSON, B. G. The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 30, p. 28532-40, 2001.

BOURDOULOUS, S.; OREND, G.; MACKENNA, D. A.; PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression. **J Cell Biol**, v. 143, n. 1, p. 267-76, 1998.

BRITO, J. M.; TEILLET, M. A.; LE DOUARIN, N. M. An early role for sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: ensuring neural crest cell survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 31, p. 11607-12, 2006.

BRITTAN, M.; WRIGHT, N. A. The gastrointestinal stem cell. **Cell Prolif**, v. 37, n. 1, p. 35-53, 2004.

BRONNER-FRASER, M. Distribution and function of tenascin during cranial neural crest development in the chick. **J Neurosci Res**, v. 21, n. 2-4, p. 135-47, 1988.

BROWN, J. C.; TIMPL, R. The collagen superfamily. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 107, n. 4, p. 484-90, 1995.

CANO, A.; PEREZ-MORENO, M. A.; RODRIGO, I.; LOCASCIO, A.; BLANCO, M. J.; DEL BARRIO, M. G.; PORTILLO, F.; NIETO, M. A. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. 76-83, 2000.

CARDARELLI, P. M.; YAMAGATA, S.; TAGUCHI, I.; GORCSAN, F.; CHIANG, S. L.; LOBL, T. The collagen receptor alpha 2 beta 1, from MG-63 and HT1080 cells, interacts with a cyclic RGD peptide. **J Biol Chem**, v. 267, n. 32, p. 23159-64, 1992.

CHRISTIANSEN, J. H.; COLES, E. G.; WILKINSON, D. G. Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 6, p. 719-24, 2000.

CHUNG, C. H.; AU, L. C.; HUANG, T. F. Molecular cloning and sequence analysis of aggretin, a collagen-like platelet aggregation inducer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 263, n. 3, p. 723-7, 1999.

CLARKE, D. L.; JOHANSSON, C. B.; WILBERTZ, J.; VERESS, B.; NILSSON, E.; KARLSTROM, H.; LENDAHL, U.; FRISEN, J. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, v. 288, n. 5471, p. 1660-3, 2000.

CLARKE, P. G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat Embryol (Berl)**, v. 181, n. 3, p. 195-213, 1990.

COGLE, C. R.; WAINMAN, D. A.; JORGENSEN, M. L.; GUTHRIE, S. M.; MAMES, R. N.; SCOTT, E. W. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 133-5, 2004.

COLES, E. G.; GAMMILL, L. S.; MINER, J. H.; BRONNER-FRASER, M. Abnormalities in neural crest cell migration in laminin alpha5 mutant mice. **Dev Biol**, v. 289, n. 1, p. 218-28, 2006.

COLOGNATO, H.; WINKELMANN, D. A.; YURCHENCO, P. D. Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. **J Cell Biol**, v. 145, n. 3, p. 619-31, 1999.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev Dyn**, v. 218, n. 2, p. 213-34, 2000.

COSTA, M. C. **Estudo dos efeitos da matriz extracelular na morfogênese da crista neural em *Coturnix coturnix japonica***. 2006. 62 f. Trabalho de conclusão de curso de Ciências Biológicas - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CROSBY, H. A.; STRAIN, A. J. Adult liver stem cells: bone marrow, blood, or liver derived? **Gut**, v. 48, n. 2, p. 153-4, 2001.

DARLAND, T.; LEBLANC, G. G. Immortalized Hensen's node cells secrete a factor that regulates avian neural crest cell fates in vitro. **Dev Biol**, v. 176, n. 1, p. 62-75, 1996.

DARRIBERE, T.; SKALSKI, M.; COUSIN, H. L.; GAULTIER, A.; MONTMORY, C.; ALFANDARI, D. Integrins: regulators of embryogenesis. **Biol Cell**, v. 92, n. 1, p. 5-25, 2000.

DAVIE, N. J.; CROSSNO, J. T., JR.; FRID, M. G.; HOFMEISTER, S. E.; REEVES, J. T.; HYDE, D. M.; CARPENTER, T. C.; BRUNETTI, J. A.; MCNIECE, I. K.; STENMARK, K. R. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 286, n. 4, p. L668-78, 2004.

DELANNET, M.; MARTIN, F.; BOSSY, B.; CHERESH, D. A.; REICHARDT, L. F.; DUBAND, J. L. Specific roles of the alpha V beta 1, alpha V beta 3 and alpha V beta 5 integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin. **Development**, v. 120, n. 9, p. 2687-702, 1994.

DESBAN, N.; DUBAND, J. L. Avian neural crest cell migration on laminin: interaction of the alpha1beta1 integrin with distinct laminin-1 domains mediates different adhesive responses. **J Cell Sci**, v. 110 (Pt 21)2729-44, 1997.

DESMOULIERE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair Regen**, v. 13, n. 1, p. 7-12, 2005.

DONNELL, A. M.; BANNIGAN, J.; PURI, P. The effect of vagal neural crest ablation on the chick embryo cloaca. **Pediatr Surg Int**, v. 21, n. 3, p. 180-3, 2005.

DORSKY, R. I.; MOON, R. T.; RAIBLE, D. W. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. **Nature**, v. 396, n. 6709, p. 370-3, 1998.

DUBAND, J. L.; THIERY, J. P. **Distribution of laminin and collagens during avian neural crest development**. 1987. 461-78. *Development*.

DUFOUR, S.; DUBAND, J. L.; HUMPHRIES, M. J.; OBARA, M.; YAMADA, K. M.; THIERY, J. P. Attachment, spreading and locomotion of avian neural crest cells are mediated by multiple adhesion sites on fibronectin molecules. **Embo J**, v. 7, n. 9, p. 2661-71, 1988.

DUPIN, E.; GLAVIEUX, C.; VAIGOT, P.; LE DOUARIN, N. M. Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 14, p. 7882-7, 2000.

DUPLAA, C.; COUFFINHAL, T.; DUFOURCQ, P.; LLANAS, B.; MOREAU, C.; BONNET, J. The integrin very late antigen-4 is expressed in human smooth muscle cell. Involvement of alpha 4 and vascular cell adhesion molecule-1 during smooth muscle cell differentiation. **Circ Res**, v. 80, n. 2, p. 159-69, 1997.

ERICKSON, C. A.; DUONG, T. D.; TOSNEY, K. W. Descriptive and experimental analysis of the dispersion of neural crest cells along the dorsolateral path and their entry into ectoderm in the chick embryo. **Dev Biol**, v. 151, n. 1, p. 251-72, 1992.

ERICKSON, C. A.; GOINS, T. L. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. **Development**, v. 121, n. 3, p. 915-24, 1995.

EZER, S.; BAYES, M.; ELOMAA, O.; SCHLESSINGER, D.; KERE, J. Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 11, p. 2079-86, 1999.

FARWELL, A. P.; TRANTER, M. P.; LEONARD, J. L. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 3909-15, 1995.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, n. 5356, p. 1528-30, 1998.

FFRENCH-CONSTANT, C.; COLOGNATO, H. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 12, p. 678-86, 2004.

FORANDER, P.; BROBERGER, C.; STROMBERG, I. Glial-cell-line-derived neurotrophic factor induces nerve fibre formation in primary cultures of adrenal chromaffin cells. **Cell Tissue Res**, v. 305, n. 1, p. 43-51, 2001.

FRANCASTEL, C.; SCHUBELER, D.; MARTIN, D. I.; GROUDINE, M. Nuclear compartmentalization and gene activity. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 2, p. 137-43, 2000.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1028-32, 1999.

GIANCOTTI, F. G.; TARONE, G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 19, p. 173-206, 2003.

GILBERT, S. F. **Developmental biology** (7th ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. 2003, xvii, 838 p.

GREENWOOD, A. L.; TURNER, E. E.; ANDERSON, D. J. Identification of dividing, determined sensory neuron precursors in the mammalian neural crest. **Development**, v. 126, n. 16, p. 3545-59, 1999.

GUSTAFSSON, E.; FASSLER, R. Insights into extracellular matrix functions from mutant mouse models. **Exp Cell Res**, v. 261, n. 1, p. 52-68, 2000.

GUTHRIE, S. M.; CABALLERO, S.; MAMES, R. N.; GRANT, M. B.; SCOTT, E. W. Analysis of the vascular potential of hematopoietic stem cells. **Methods Mol Med**, v. 105369-80, 2005.

HALLMANN, R.; HORN, N.; SELG, M.; WENDLER, O.; PAUSCH, F.; SOROKIN, L. M. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. **Physiol Rev**, v. 85, n. 3, p. 979-1000, 2005.

HOFFMAN, M. P.; KIDDER, B. L.; STEINBERG, Z. L.; LAKHANI, S.; HO, S.; KLEINMAN, H. K.; LARSEN, M. Gene expression profiles of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching morphogenesis in vitro through BMP- and FGF-dependent mechanisms. **Development**, v. 129, n. 24, p. 5767-78, 2002.

HOLLAND, N. D.; PANGANIBAN, G.; HENYEY, E. L.; HOLLAND, L. Z. Sequence and developmental expression of *AmphiDII*, an amphioxus *Distal-less* gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest. **Development**, v. 122, n. 9, p. 2911-20, 1996.

HUANG, G. Y.; COOPER, E. S.; WALDO, K.; KIRBY, M. L.; GILULA, N. B.; LO, C. W. Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. **J Cell Biol**, v. 143, n. 6, p. 1725-34, 1998.

HUANG, X.; SAINT-JEANNET, J. P. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. **Dev Biol**, v. 275, n. 1, p. 1-11, 2004.

HUDSON, B. G.; REEDERS, S. T.; TRYGGVASON, K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. **J Biol Chem**, v. 268, n. 35, p. 26033-6, 1993.

HUGHES, S. M.; BLAU, H. M. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. **Nature**, v. 345, n. 6273, p. 350-3, 1990.

HUTSON, M. R.; KIRBY, M. L. Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. **Semin Cell Dev Biol**, v. 18, n. 1, p. 101-10, 2007.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, n. 4, p. 549-54, 1987.

ITO, K.; MORITA, T. Role of retinoic acid in mouse neural crest cell development in vitro. **Dev Dyn**, v. 204, n. 2, p. 211-8, 1995.

JEFFERY, W. R. Chordate ancestry of the neural crest: New insights from ascidians. **Semin Cell Dev Biol**, 2007.

JOHANSSON, C. B.; MOMMA, S.; CLARKE, D. L.; RISLING, M.; LENDAHL, U.; FRISEN, J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. **Cell**, v. 96, n. 1, p. 25-34, 1999.

KADLER, K. Extracellular matrix 1: Fibril-forming collagens. **Protein Profile**, v. 2, n. 5, p. 491-619, 1995.

KAMEDA, Y. Expression of glial progenitor markers p75NTR and S100 protein in the developing mouse parathyroid gland. **Cell Tissue Res**, v. 327, n. 1, p. 15-23, 2007.

KELLER, R. Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1950-4, 2002.

KIL, S. H.; KRULL, C. E.; CANN, G.; CLEGG, D.; BRONNER-FRASER, M. The alpha4 subunit of integrin is important for neural crest cell migration. **Dev Biol**, v. 202, n. 1, p. 29-42, 1998.

KIRBY, M. L.; STEWART, D. E. Neural crest origin of cardiac ganglion cells in the chick embryo: identification and extirpation. **Dev Biol**, v. 97, n. 2, p. 433-43, 1983.

KIVIRIKKO, K. I. Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. **Ann Med**, v. 25, n. 2, p. 113-26, 1993.

KIVIRIKKO, K. I.; PIHLAJANIEMI, T. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 72325-98, 1998.

KLEINMAN, H. K.; PHILP, D.; HOFFMAN, M. P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. **Curr Opin Biotechnol**, v. 14, n. 5, p. 526-32, 2003.

KOTTON, D. N.; MA, B. Y.; CARDOSO, W. V.; SANDERSON, E. A.; SUMMER, R. S.; WILLIAMS, M. C.; FINE, A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. **Development**, v. 128, n. 24, p. 5181-8, 2001.

KRAAL, G.; VAN DER LAAN, L. J.; ELOMAA, O.; TRYGGVASON, K. The macrophage receptor MARCO. **Microbes Infect**, v. 2, n. 3, p. 313-6, 2000.

KRAMEROVA, I. A.; KRAMEROV, A. A.; FESSLER, J. H. Alternative splicing of papilin and the diversity of Drosophila extracellular matrix during embryonic morphogenesis. **Dev Dyn**, v. 226, n. 4, p. 634-42, 2003.

KUCHENBAUER, F.; HOPFNER, U.; STALLA, J.; ARZT, E.; STALLA, G. K.; PAEZPEREDA, M. Extracellular matrix components regulate ACTH production and proliferation in corticotroph tumor cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 175, n. 1-2, p. 141-8, 2001.

LAHAV, R.; DUPIN, E.; LECOIN, L.; GLAVIEUX, C.; CHAMPEVAL, D.; ZILLER, C.; LE DOUARIN, N. M. Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 24, p. 14214-9, 1998.

LANDOLT, R. M.; VAUGHAN, L.; WINTERHALTER, K. H.; ZIMMERMANN, D. R. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. **Development**, v. 121, n. 8, p. 2303-12, 1995.

LAYWELL, E. D.; STEINDLER, D. A. Glial stem-like cells: implications for ontogeny, phylogeny, and CNS regeneration. **Prog Brain Res**, v. 138435-50, 2002.

LE DOUARIN, N. M. **The neural crest**. Cambridge: Cambridge University Press. 1999,

LE LIEVRE, C. S.; LE DOUARIN, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. **J Embryol Exp Morphol**, v. 34, n. 1, p. 125-54, 1975.

LEBLANC, G. G. Rostrocaudal differences in the expression of extracellular matrix proteins by avian neural crest cells in vitro. **Cell Tissue Res**, v. 277, n. 1, p. 97-106, 1994.

LECHNER, A.; HABENER, J. F. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, n. 2, p. E259-66, 2003.

LECHNER, A.; LEECH, C. A.; ABRAHAM, E. J.; NOLAN, A. L.; HABENER, J. F. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 293, n. 2, p. 670-4, 2002.

LEIMEROTH, R.; LOBSIGER, C.; LUSSI, A.; TAYLOR, V.; SUTER, U.; SOMMER, L. Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent Progenitor cells. **Dev Biol**, v. 246, n. 2, p. 245-58, 2002.

LEROU, P. H.; DALEY, G. Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. **Blood Rev**, v. 19, n. 6, p. 321-31, 2005.

LESKINEN, M. J.; LINDSTEDT, K. A.; WANG, Y.; KOVANEN, P. T. Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by a mechanism involving fibronectin degradation and disruption of focal adhesions. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 2, p. 238-43, 2003.

LI, F.; LUO, Z.; HUANG, W.; LU, Q.; WILCOX, C. S.; JOSE, P. A.; CHEN, S. Response gene to complement 32, a novel regulator for transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation of neural crest cells. **J Biol Chem**, v. 282, n. 14, p. 10133-7, 2007.

LI, S.; HARRISON, D.; CARBONETTO, S.; FASSLER, R.; SMYTH, N.; EDGAR, D.; YURCHENCO, P. D. Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. **J Cell Biol**, v. 157, n. 7, p. 1279-90, 2002.

LORING, J.; GLIMELIUS, B.; WESTON, J. A. Extracellular matrix materials influence quail neural crest cell differentiation in vitro. **Dev Biol**, v. 90, n. 1, p. 165-74, 1982.

MANNI, L.; LANE, N. J.; BURIGHEL, P.; ZANIOLO, G. Are neural crest and placodes exclusive to vertebrates? **Evol Dev**, v. 3, n. 5, p. 297-8, 2001.

MANUELIDIS, L. Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 10, p. 3123-7, 1984.

MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 2, p. 120-9, 2000.

MAYOR, R.; MORGAN, R.; SARGENT, M. G. Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. **Development**, v. 121, n. 3, p. 767-77, 1995.

MCCAULEY, D. W.; BRONNER-FRASER, M. Importance of SoxE in neural crest development and the evolution of the pharynx. **Nature**, v. 441, n. 7094, p. 750-2, 2006.

MILNER, R. A novel three-dimensional system to study interactions between endothelial cells and neural cells of the developing central nervous system. **BMC Neurosci**, v. 83, 2007.

MORLA, A. O.; MOGFORD, J. E. Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 272, n. 1, p. 298-302, 2000.

MOULD, A. P.; ASKARI, J. A.; AOTA, S.; YAMADA, K. M.; IRIE, A.; TAKADA, Y.; MARDON, H. J.; HUMPHRIES, M. J. Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit. **J Biol Chem**, v. 272, n. 28, p. 17283-92, 1997.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens and collagen-related diseases. **Ann Med**, v. 33, n. 1, p. 7-21, 2001.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 12-8, 2000.

NAGEL, M.; WINKLBAUER, R. Establishment of substratum polarity in the blastocoel roof of the *Xenopus* embryo. **Development**, v. 126, n. 9, p. 1975-84, 1999.

NAKAMURA, H.; AYER-LE LIEVRE, C. S. Mesectodermal capabilities of the trunk neural crest of birds. **J Embryol Exp Morphol**, v. 701-18, 1982.

NAKAMURA, T.; COLBERT, M. C.; ROBBINS, J. Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. **Circ Res**, v. 98, n. 12, p. 1547-54, 2006.

NEWGREEN, D.; THIERY, J. P. Fibronectin in early avian embryos: synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. **Cell Tissue Res**, v. 211, n. 2, p. 269-91, 1980.

NEWGREEN, D. F. Physical influences on neural crest cell migration in avian embryos: contact guidance and spatial restriction. **Dev Biol**, v. 131, n. 1, p. 136-48, 1989.

NGUYEN, N. M.; SENIOR, R. M. Laminin isoforms and lung development: all isoforms are not equal. **Dev Biol**, v. 294, n. 2, p. 271-9, 2006.

NICHOLS, D. H. Formation and distribution of neural crest mesenchyme to the first pharyngeal arch region of the mouse embryo. **Am J Anat**, v. 176, n. 2, p. 221-31, 1986.

NIETO, M. A.; SARGENT, M. G.; WILKINSON, D. G.; COOKE, J. Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. **Science**, v. 264, n. 5160, p. 835-9, 1994.

OBARA, M.; YOSHIZATO, K. Possible involvement of the interaction of the alpha 5 subunit of alpha 5 beta 1 integrin with the synergistic region of the central cell-binding domain of fibronectin in cells to fibronectin binding. **Exp Cell Res**, v. 216, n. 1, p. 273-6, 1995.

OKAMOTO, R.; YAJIMA, T.; YAMAZAKI, M.; KANAI, T.; MUKAI, M.; OKAMOTO, S.; IKEDA, Y.; HIBI, T.; INAZAWA, J.; WATANABE, M. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. **Nat Med**, v. 8, n. 9, p. 1011-7, 2002.

OLSEN, B. R. New insights into the function of collagens from genetic analysis. **Curr Opin Cell Biol**, v. 7, n. 5, p. 720-7, 1995.

OSUMI-YAMASHITA, N.; NINOMIYA, Y.; DOI, H.; ETO, K. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. **Dev Biol**, v. 164, n. 2, p. 409-19, 1994.

PENG, H.; HUARD, J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. **Transpl Immunol**, v. 12, n. 3-4, p. 311-9, 2004.

PEREIRA, R. F.; HALFORD, K. W.; O'HARA, M. D.; LEEPER, D. B.; SOKOLOV, B. P.; POLLARD, M. D.; BAGASRA, O.; PROCKOP, D. J. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 11, p. 4857-61, 1995.

PERRIS, R.; KROTOSKI, D.; BRONNER-FRASER, M. Collagens in avian neural crest development: distribution in vivo and migration-promoting ability in vitro. **Development**, v. 113, n. 3, p. 969-84, 1991.

PERRIS, R.; KROTOSKI, D.; LALLIER, T.; DOMINGO, C.; SORRELL, J. M.; BRONNER-FRASER, M. Spatial and temporal changes in the distribution of proteoglycans during avian neural crest development. **Development**, v. 111, n. 2, p. 583-99, 1991.

PERRIS, R.; KUO, H. J.; GLANVILLE, R. W.; BRONNER-FRASER, M. Collagen type VI in neural crest development: distribution in situ and interaction with cells in vitro. **Dev Dyn**, v. 198, n. 2, p. 135-49, 1993a.

PERRIS, R.; PERISSINOTTO, D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. **Mech Dev**, v. 95, n. 1-2, p. 3-21, 2000.

PERRIS, R.; PERISSINOTTO, D.; PETTWAY, Z.; BRONNER-FRASER, M.; MORGELIN, M.; KIMATA, K. Inhibitory effects of PG-H/aggrecan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration. **Faseb J**, v. 10, n. 2, p. 293-301, 1996.

PERRIS, R.; SYFRIG, J.; PAULSSON, M.; BRONNER-FRASER, M. Molecular mechanisms of neural crest cell attachment and migration on types I and IV collagen. **J Cell Sci**, v. 106 (Pt 4)1357-68, 1993b.

PESHEVA, P.; PROBSTMEIER, R. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. **Prog Neurobiol**, v. 61, n. 5, p. 465-93, 2000.

PINCO, K. A.; LIU, S.; YANG, J. T. $\alpha 4$ integrin is expressed in a subset of cranial neural crest cells and in epicardial progenitor cells during early mouse development. **Mech Dev**, v. 100, n. 1, p. 99-103, 2001.

PISANO, J. M.; BIRREN, S. J. Restriction of developmental potential during divergence of the enteric and sympathetic neuronal lineages. **Development**, v. 126, n. 13, p. 2855-68, 1999.

PLA, P.; LARUE, L. Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. **Int J Dev Biol**, v. 47, n. 5, p. 315-25, 2003.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 403-34, 1995.

REICHARDT, L. F.; TOMASELLI, K. J. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. **Annu Rev Neurosci**, v. 14, p. 531-70, 1991.

REISSMANN, E.; ERNSBERGER, U.; FRANCIS-WEST, P. H.; RUEGER, D.; BRICKELL, P. M.; ROHRER, H. Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. **Development**, v. 122, n. 7, p. 2079-88, 1996.

RING, C.; HASSELL, J.; HALFTER, W. Expression pattern of collagen IX and potential role in the segmentation of the peripheral nervous system. **Dev Biol**, v. 180, n. 1, p. 41-53, 1996.

ROBINSON, V.; SMITH, A.; FLENNIKEN, A. M.; WILKINSON, D. G. Roles of Eph receptors and ephrins in neural crest pathfinding. **Cell Tissue Res**, v. 290, n. 2, p. 265-74, 1997.

ROGERS, S. L.; BERNARD, L.; WESTON, J. A. Substratum effects on cell dispersal, morphology, and differentiation in cultures of avian neural crest cells. **Dev Biol**, v. 141, n. 1, p. 173-82, 1990.

SANDERS, R. C., JR.; SLAYTON, W. B.; COGLE, C. R.; FISHER, R. C.; SCOTT, E. W. Stem cell research. **Paediatr Respir Rev**, v. 7, n. 2, p. 135-40, 2006.

SASAKI, T.; FASSLER, R.; HOHENESTER, E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. **J Cell Biol**, v. 164, n. 7, p. 959-63, 2004.

SASTRY, P. S.; RAO, K. S. Apoptosis and the nervous system. **J Neurochem**, v. 74, n. 1, p. 1-20, 2000.

SCHAUMBURG-LEVER, G.; LEVER, I.; FEHRENBACHER, B.; MOLLER, H.; BISCHOF, B.; KAISERLING, E.; GARBE, C.; RASSNER, G. Melanocytes in nevi and melanomas synthesize basement membrane and basement membrane-like material. An immunohistochemical and electron microscopic study including immunoelectron microscopy. **J Cutan Pathol**, v. 27, n. 2, p. 67-75, 2000.

SCHINKE, M.; IZUMO, S. Getting to the heart of DiGeorge syndrome. **Nat Med**, v. 5, n. 10, p. 1120-1, 1999.

SCHNEIDER, C.; WICHT, H.; ENDERICH, J.; WEGNER, M.; ROHRER, H. Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. **Neuron**, v. 24, n. 4, p. 861-70, 1999.

SCHWARTZ, M. A. Integrin signaling revisited. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 12, p. 466-70, 2001.

SCHWARZBAUER, J. E.; SECHLER, J. L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, n. 5, p. 622-7, 1999.

SECHLER, J. L.; SCHWARZBAUER, J. E. Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. **J Biol Chem**, v. 273, n. 40, p. 25533-6, 1998.

SERINI, G.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; ROPRAZ, P.; GEINOZ, A.; BORSI, L.; ZARDI, L.; GABBIANI, G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. **J Cell Biol**, v. 142, n. 3, p. 873-81, 1998.

SHAH, N. M.; GROVES, A. K.; ANDERSON, D. J. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. **Cell**, v. 85, n. 3, p. 331-43, 1996.

SHEPPARD, A. M.; ONKEN, M. D.; ROSEN, G. D.; NOAKES, P. G.; DEAN, D. C. Expanding roles for alpha 4 integrin and its ligands in development. **Cell Adhes Commun**, v. 2, n. 1, p. 27-43, 1994.

SHIMELD, S. M.; HOLLAND, P. W. Vertebrate innovations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 9, p. 4449-52, 2000.

SHIMIZU, H.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; LEONTOVICH, A.; FEI, K.; YAN, L.; SARRAS, M. P., JR. Epithelial morphogenesis in hydra requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. **Development**, v. 129, n. 6, p. 1521-32, 2002.

SOTTILE, J.; HOCKING, D. C.; SWIATEK, P. J. Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. **J Cell Sci**, v. 111 (Pt 19)2933-43, 1998.

SRIVASTAVA, A. K.; PISPA, J.; HARTUNG, A. J.; DU, Y.; EZER, S.; JENKS, T.; SHIMADA, T.; PEKKANEN, M.; MIKKOLA, M. L.; KO, M. S.; THESLEFF, I.; KERE, J.; SCHLESSINGER, D. The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 24, p. 13069-74, 1997.

STEINDLER, D. A. Neural stem cells, scaffolds, and chaperones. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 11, p. 1091-3, 2002.

STEINDLER, D. A.; KADRIE, T.; FILLMORE, H.; THOMAS, L. B. The subependymal zone: "brain marrow". **Prog Brain Res**, v. 108349-63, 1996.

STEINDLER, D. A.; LAYWELL, E. D. Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype, and translation. **Glia**, v. 43, n. 1, p. 62-9, 2003.

STERN, C. D. Induction and initial patterning of the nervous system - the chick embryo enters the scene. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 4, p. 447-51, 2002.

STRACHAN, L. R.; CONDIC, M. L. Cranial neural crest recycle surface integrins in a substratum-dependent manner to promote rapid motility. **J Cell Biol**, v. 167, n. 3, p. 545-54, 2004.

STRACHAN, L. R.; CONDIC, M. L. Neural crest motility and integrin regulation are distinct in cranial and trunk populations. **Dev Biol**, v. 259, n. 2, p. 288-302, 2003.

STRAIN, A. J.; CROSBY, H. A.; NIJJAR, S.; KELLY, D. A.; HUBSCHER, S. G. Human liver-derived stem cells. **Semin Liver Dis**, v. 23, n. 4, p. 373-84, 2003.

STREULI, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, n. 5, p. 634-40, 1999.

SUMMER, R.; KOTTON, D. N.; SUN, X.; MA, B.; FITZSIMMONS, K.; FINE, A. Side population cells and Bcrp1 expression in lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 285, n. 1, p. L97-104, 2003.

TAKANO, N.; KAWAKAMI, T.; KAWA, Y.; ASANO, M.; WATABE, H.; ITO, M.; SOMA, Y.; KUBOTA, Y.; MIZOGUCHI, M. Fibronectin combined with stem cell factor plays an important role in melanocyte proliferation, differentiation and migration in cultured mouse neural crest cells. **Pigment Cell Res**, v. 15, n. 3, p. 192-200, 2002.

TAN, S. S.; CROSSIN, K. L.; HOFFMAN, S.; EDELMAN, G. M. Asymmetric expression in somites of cytotactin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell distribution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 22, p. 7977-81, 1987.

TANZER, M. L. Current concepts of extracellular matrix. **J Orthop Sci**, v. 11, n. 3, p. 326-31, 2006.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, 1998.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-6, 1998.

TORRA, R.; TAZON-VEGA, B.; ARS, E.; BALLARIN, J. Collagen type IV (alpha3-alpha4) nephropathy: from isolated haematuria to renal failure. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, n. 10, p. 2429-32, 2004.

TRAINOR, P. A. Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. **Semin Cell Dev Biol**, v. 16, n. 6, p. 683-93, 2005.

TRENTIN, A.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 13, p. 4495-500, 2004.

TRENTIN, A. G.; DE AGUIAR, C. B.; GARCEZ, R. C.; ALVAREZ-SILVA, M. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion. **Glia**, v. 42, n. 4, p. 359-69, 2003.

VARLEY, J. E.; MAXWELL, G. D. BMP-2 and BMP-4, but not BMP-6, increase the number of adrenergic cells which develop in quail trunk neural crest cultures. **Exp Neurol**, v. 140, n. 1, p. 84-94, 1996.

VENSTROM, K. A.; REICHARDT, L. F. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. **Faseb J**, v. 7, n. 11, p. 996-1003, 1993.

VILLEGAS, S. N.; NJAINE, B.; LINDEN, R.; CARRI, N. G. Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol (EtOH) induced B92 glial cell death by both PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. **Brain Res Bull**, v. 71, n. 1-3, p. 116-26, 2006.

WALDO, K. L.; LO, C. W.; KIRBY, M. L. Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. **Dev Biol**, v. 208, n. 2, p. 307-23, 1999.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 157-68, 2000a.

WEISSMAN, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1442-6, 2000b.

WHITE, P. M.; ANDERSON, D. J. In vivo transplantation of mammalian neural crest cells into chick hosts reveals a new autonomic sublineage restriction. **Development**, v. 126, n. 19, p. 4351-63, 1999.

WONG, C. E.; PARATORE, C.; DOURS-ZIMMERMANN, M. T.; ROCHAT, A.; PIETRI, T.; SUTER, U.; ZIMMERMANN, D. R.; DUFOUR, S.; THIERY, J. P.; MEIJER, D.; BEERMANN, F.; BARRANDON, Y.; SOMMER, L. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. **J Cell Biol**, v. 175, n. 6, p. 1005-15, 2006.

WOODS, A.; LONGLEY, R. L.; TUMOVA, S.; COUCHMAN, J. R. Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. **Arch Biochem Biophys**, v. 374, n. 1, p. 66-72, 2000.

WU, C.; KEIGHTLEY, S. Y.; LEUNG-HAGESTEIJN, C.; RADEVA, G.; COPPOLINO, M.; GOICOECHEA, S.; MCDONALD, J. A.; DEDHAR, S. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. **J Biol Chem**, v. 273, n. 1, p. 528-36, 1998.

XIAN-GUANG, H.; ALDRIDGE, R. J.; SIVETER, D. J.; SIVETER, D. J.; XIANG-HONG, F. New evidence on the anatomy and phylogeny of the earliest vertebrates. **Proc Biol Sci**, v. 269, n. 1503, p. 1865-9, 2002.

XU, C.; INOKUMA, M. S.; DENHAM, J.; GOLDS, K.; KUNDU, P.; GOLD, J. D.; CARPENTER, M. K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 10, p. 971-4, 2001.

ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. **Micron**, v. 32, n. 4, p. 427-38, 2001.

ZHANG, Y.; HERMAN, B. Ageing and apoptosis. **Mech Ageing Dev**, v. 123, n. 4, p. 245-60, 2002.